

**Estudos de nutrição para a produção de  
clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* em  
cultura líquida estacionária**

Sérgio Filipe Bom Duarte

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e  
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para  
obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Engenheiro Carlos Franco  
Co-orientador: Prof<sup>a</sup> Doutora Cecília Roque  
Co-orientador: Doutor Paulo Lemos

**Lisboa**

**2009**

---

## **Prefácio**

Esta dissertação foi realizada no âmbito do Mestrado em Biotecnologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Teve como orientador o Engenheiro Carlos Franco e como co-orientadores a Prof<sup>a</sup> Doutora Cecília Roque e o Doutor Paulo Lemos. O principal objectivo do presente trabalho foi o estudo dos elementos nutritivos associados à produção de clamidósporos pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* em cultura líquida estacionária. O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Micologia Aplicada (ICAAM), da Universidade de Évora e financiado pela empresa Clamitec, Myco Solutions, Lda.

---

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. Ao Eng. Carlos Franco a dedicação, disponibilidade, e todos os conhecimentos transmitidos ao longo do trabalho. À Prof<sup>a</sup> Doutora Cecília Roque e ao Doutor Paulo Lemos pelo apoio e orientação. À Dra. Susana Magriço e à Dra. Liliana Vinagre pelo companheirismo, apoio, disponibilidade e paciência demonstrada ao longo de todo este tempo. À Clamitec, Myco Solutions, Lda pelo interesse e disponibilidade demonstrada para a realização deste trabalho.

À Ariana e ao Telmo, por todo o apoio e amizade. Aos meus pais, a quem dedico este trabalho, obrigado pela paciência, carinho, generosidade e compreensão. Obrigado por serem quem são!

---

## Resumo

O fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*, estirpe PcMR, tem a capacidade de produzir clamidósporos em cultura líquida. Neste estudo quantificou-se o efeito da adição de hidratos de carbono (glucose, sacarose ou amido) ao meio basal de produção de clamidósporos (ALMA), e o efeito da substituição da lecitina no meio ALMA por outro lípido (ácidos gordos ou triglicéridos). Determinou-se as curvas de crescimento de clamidósporos e peso seco para o meio basal e meios ALMA + glucose, sendo medido o consumo de albumina, lecitina e glucose.

Foram obtidas produções elevadas de clamidósporos (superior a  $5 \times 10^5$  clamidósporos/ml) nos meios com 0 a 5g/L de glucose ou sacarose. A adição de maiores quantidades de hidratos de carbono ao meio ALMA leva à diminuição da produção de clamidósporos e a um aumento proporcional do peso seco.

Ácidos gordos insaturados no meio ALMA permitem obter produções de clamidósporos superiores às obtidas com ácidos gordos saturados ou triglicéridos mas inferiores às obtidas com lecitina. No entanto, o peso seco final é menor quando se utiliza meio ALMA contendo ácidos gordos insaturados do que com quando se utilizam os restantes lípidos mais complexos estudados.

O fungo desenvolve-se mais rapidamente nos meios com glucose, embora nesses meios a produção de clamidósporos se inicie mais tarde. Com elevadas quantidades de glucose no meio, o consumo de albumina é limitado, e a produção de clamidósporos é reduzida.

Estes resultados mostram que os meios líquidos podem ser utilizados para a produção de elevadas quantidades de clamidósporos, permitem estabelecer alguns dos componentes mais importantes no processo de optimização industrial, e estabelecem a lecitina como o lípido mais importante na produção de clamidósporos.

**Palavras-chave:** *Pochonia chlamydosporia*, cultura líquida, clamidósporos, peso seco, hidratos de carbono, lípidos, curva de crescimento.

---

## Abstract

The nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*, strain PcMR, has the ability to produce chlamydospores in liquid culture. This study quantified the effect of adding carbohydrates (glucose, sucrose or starch) to the basal medium for chlamydospores production (ALMA), and the effect of replacing lecithin in the ALMA medium by other lipid (fatty acids or triglycerides) for chlamydospore production and dry weight. The chlamydospores and dry weight growth curves were determined for basal medium and ALMA + glucose, and the consumption of albumin, lecithin and glucose measured.

High chlamydospore productions (over  $5 \times 10^5$  chlamydospore/ml) were obtained in 0 to 5 g/L of glucose or sucrose. The addition of higher amounts of carbohydrates to ALMA medium led to a decrease in the chlamydospore production and to a proportional increase in dry weight.

Unsaturated fatty acid in ALMA medium allows higher chlamydospore production than the saturated fatty acids or triglycerides but lower than lecithin. However, the final dry weight is lower using fatty acids than using the more complex lipids studied.

The fungus development was faster in media containing glucose, however in those media the chlamydospore production started in a later stage. With high levels of glucose in the media, albumin consumption is limited, and chlamydospore production is reduced.

These results show that liquid medium can be used to produce large amounts of chlamydospores and define some of the most important traits in industrial process optimization, and establish the lecithin as the most important lipid in chlamydospore production.

**Keywords:** *Pochonia chlamydosporia*, liquid culture, chlamydospores, dry weight, carbohydrates, lipids, growth curve.

---

<b>Índice</b>	
Prefácio	ii
Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Palavras-chave	iv
Abstract	v
Keywords	v
Índice	vi
Índice de figuras	iv
Índice de tabelas	x
Abreviaturas	xi
1. Introdução	1
1.1. O fungo <i>Pochonia chlamydosporia</i> como agente de controlo biológico contra o Nemátode-das-galhas-radiculares (NGR)	1
1.2. Caracterização do NGR	1
1.2.1. Controlo Químico vs. Biológico	2
1.2.1.1. A utilização de microrganismos como agentes de controlo biológico contra nemátodes	3
1.2.2. <i>Pochonia chlamydosporia</i> como agente de controlo biológico contra NRG	4
1.2.2.1. Selecção da estirpe PcMR	5
1.3. Caracterização do fungo <i>Pochonia chlamydosporia</i>	6
1.3.1. Classificação taxonómica	6
1.3.2. Biologia do fungo	6
1.3.3. Caracterização Morfológica	7
1.3.3.1. Papel dos clamidósporos no parasitismo do NGR	8

---

1.4.	Produção do inóculo de <i>Pochonia chlamydosporia</i>	8
1.4.1.	Produção de inóculo em massa	8
1.4.1.1.	Esporos como fonte de inóculo	9
1.4.1.1.1.	Clamidósporos como fonte de inóculo	10
1.4.2.	Meios de cultura	11
1.4.2.1.	Produção de clamidósporos de PcMR em meio líquido	12
1.4.2.2.	Processos de extracção	13
1.4.3.	Nutrição do fungo vs Esporulação	14
1.4.3.1.	Fontes de carbono	15
1.4.3.2.	Fontes de azoto	16
1.4.3.3.	Razão carbono/azoto	17
1.4.3.4.	Outros Nutrientes	18
1.5.	Objectivos	19
2.	Materiais e Métodos	21
2.1.	Delineamento experimental	21
2.2.	Procedimentos experimentais	21
2.2.1.	Microrganismos e meios de cultura	21
2.2.1.1.	Estirpe PcMR	21
2.2.1.2.	Preparação do inóculo	22
2.2.1.3.	Meio de cultura ALMA	22
2.2.2.	Parâmetros de análise	23
2.2.2.1.	Contagem dos clamidósporos	23
2.2.2.2.	Determinação do peso seco	24
2.2.2.3.	Determinação dos Nutrientes	24

---

2.2.2.3.1. Albumina	25
2.2.2.3.2. Lecitina	25
2.2.2.3.3. Glucose	26
2.2.3. Estudos de avaliação da importância dos nutrientes	27
2.2.3.1. Alteração dos constituintes do meio de cultura	27
2.2.3.1.1. Hidratos de carbono	27
2.2.3.1.2. Lípidos	28
2.2.3.1.2.1. Substituição da lecitina	28
2.2.3.1.2.2. Aumento da concentração de ácidos gordos	28
2.2.3.2. Curvas de crescimento	28
2.2.4. Análise estatística	30
3. Estudo dos Hidratos de carbono e lípidos	31
3.1. Efeito dos Hidratos de carbono na produção de clamidósporos e peso seco de PcMR – Resultados e discussão	31
3.2. Efeito dos Lípidos na produção de clamidósporos e peso seco de PcMR – Resultados e discussão	38
3.3. Conclusões	46
4. Curvas de crescimento de PcMR – Resultados e discussão	47
5. Conclusão	54
6. Considerações finais e perspectivas futuras	56
7. Referências Bibliográficas	58

## Anexos



---

## Índice de figuras

Figura 1.1 – Fêmea de <i>Meloidogyne</i> spp. inserida na raiz e ovos (SEM).	1
Figura 1.2 – Raiz com galhas causadas por <i>Meloidogyne</i> spp.	2
Figura 1.3 – <i>P. chlamydosporia</i> a parasitar massa de ovos de NGR (SEM).	4
Figura 1.4 – Colônia de <i>Pochonia chlamydosporia</i> em MEA.	7
Figura 1.5 – <i>P. chlamydosporia</i> a parasitar ovo de NGR (SEM).	8
Figura 2.1 – Delineamento experimental.	21
Figura 2.2 – Método de preparação do meio ALMA para produção de clamidósporos de <i>Pochonia chlamydosporia</i> .	23
Figura 2.3 – Método quantitativo da produção de clamidósporos.	24
Figura 2.4 – Curva de calibração da albumina.	25
Figura 2.5 – Curva de calibração da lecitina.	26
Figura 2.6 – Curva de calibração da glucose.	27
Figura 2.7 – Evolução do fungo no meio ALMA + 5g de glucose.	29
Figura 3.1 – Efeito da glucose na produtividade volumétrica de clamidósporos e no peso seco de PcMR.	31
Figura 3.2 – Produção de clamidósporos em função do peso seco nos meios ALMA + glucose.	32
Figura 3.3 – Efeito da sacarose na produtividade volumétrica de clamidósporos e no peso seco de PcMR.	33
Figura 3.4 – Produção de clamidósporos em função do peso seco dos meios ALMA + sacarose.	33
Figura 3.5 – Efeito do amido na produtividade volumétrica de clamidósporos e no peso seco de PcMR.	34
Figura 3.6 – Produção de clamidósporos em função do peso seco dos meios ALMA + amido.	35
Figura 3.7 – Efeito dos ácidos gordos na produtividade volumétrica de clamidósporos e no peso seco de PcMR.	38
Figura 3.8 – Efeito dos Ác. gordos na produção de clamidósporos em função do peso seco de PcMR.	39

---

Figura 3.9 – Efeito da concentração de ácido oleico na produtividade volumétrica de clamidósporos e no peso seco de PcMR.	<b>41</b>
Figura 3.10 – Efeito da concentração do ácido oleico na produção de clamidósporos em função do peso seco de PcMR.	<b>42</b>
Figura 3.11 – Efeito da concentração de ácido palmítico na produtividade volumétrica de clamidósporos e no peso seco de PcMR.	<b>42</b>
Figura 3.12 – Efeito da concentração do ácido palmitico na produção de clamidósporos em função do peso seco de PcMR.	<b>43</b>
Figura 3.13 – Efeito dos triglicéridos na produtividade volumétrica de clamidósporos e no peso seco de PcMR.	<b>44</b>
Figura 3.14 – Efeito dos triglicéridos na produção de clamidósporos em função do peso seco de PcMR.	<b>44</b>
Figura 4.1 – Curva de crescimento de PcMR em meio ALMA..	<b>47</b>
Figura 4.2 – Curva de crescimento de PcMR em meio ALMA+ 5g de glucose (1º Ensaio).	<b>48</b>
Figura 4.3 – Curva de crescimento de PcMR em meio ALMA + 5 g de glucose (2º Ensaio).	<b>48</b>
Figura 4.4 – Curva de crescimento de PcMR em meio ALMA + 15g de glucose.	<b>49</b>
Figura 4.5 – Produção de clamidósporos em função do peso seco nos meios ALMA, ALMA + 5g (1º Ensaio), ALMA + 5g (2º Ensaio) e ALMA + 15g.	<b>52</b>

### **Índice de tabelas**

Tabela 1.1 – Classificação taxonómica do fungo Pochonia chlamydosporia	<b>6</b>
Tabela 4.1 – Rendimentos da produtividade volumétrica de clamidósporos e peso seco nos meios estudados.	<b>53</b>

---

## Abreviaturas

<b>ALMA</b>	Meio de cultura líquido, constituído por albumina, lecitina e mistura de sais API
<b>ALMA +15g</b>	Meio de cultura líquido, constituído por albumina, lecitina, 15g de glucose e mistura de sais API
<b>ALMA +5g</b>	Meio de cultura líquido, constituído por albumina, lecitina, 5g de glucose e mistura de sais API
<b>a<sub>w</sub></b>	Actividade da água
<b>CMA</b>	Corn Meal Agar – Agar de farinha de milho
<b>ICAAM</b>	Instituto das ciências agrárias e ambiente mediterrânicas
<b>LabMic</b>	Laboratório de Micologia Aplicada da Universidade de Évora
<b>MEA</b>	Malt extrat agar
<b>NGR</b>	Nemátode-das-galhas-radiculares
<b>PcMR</b>	Estirpe de <i>Pochonia chlamydosporia</i> utilizada neste trabalho
<b>SEM</b>	Microscopia electrónica de varrimento (Scanning electronic microscopy)
<b>Sig.</b>	Nível de significância
<b>SPSS</b>	Statistic Package for Social Sciences
<b>Yclam/Peso Seco</b>	Rendimento do peso seco em clamidósporos de PcMR
<b>Yclam/Albumina</b>	Rendimento da albumina em clamidósporos de PcMR
<b>Yclam/Lecitina</b>	Rendimento da lecitina em clamidósporos de PcMR
<b>Yclam/Glucose</b>	Rendimento da glucose em clamidósporos de PcMR
<b>Yclam/Substrato Total</b>	Rendimento do substrato total em clamidósporos de PcMR
<b>YPeso Seco/Albumina</b>	Rendimento da albumina em peso seco de PcMR
<b>YPeso Seco/Lecitina</b>	Rendimento da lecitina em peso seco de PcMR
<b>YPeso Seco/Glucose</b>	Rendimento da glucose em peso seco de PcMR

## 1. INTRODUÇÃO

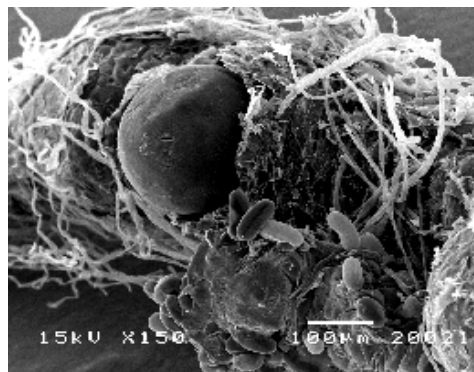
### 1.1 O fungo *Pochonia chlamydosporia* como agente de controlo biológico contra o Nemátode-das-galhas-radiculares (NGR)

O nemátode das galhas radiculares (NGR) (*Meloidogyne* spp.) é responsável por um dos principais problemas fitossanitários da rizosfera em Portugal e em vários outros países europeus. Vários pesticidas são utilizados no combate a este problema, contudo muitos têm sido retirados do mercado devido ao elevado impacto no ambiente e ao risco para a saúde humana. Como exemplo, temos o brometo de metilo que foi banido do mercado em 2005 devido à sua forte acção depletora da camada de ozono. Desta forma, tem sido estimulado o aparecimento de alternativas ao uso de pesticidas, nomeadamente no âmbito do controlo biológico. O fungo *Pochonia chlamydosporia* encontra-se entre os organismos antagonistas que têm suscitado maior interesse e os estudos efectuados apontam para a possibilidade da sua comercialização num futuro próximo.

### 1.2 Caracterização do NGR

Os nemátodes das galhas radiculares (NGR), género *Meloidogyne*, são endoparasitas obrigatórios necessitando de uma planta hospedeira para concluir o seu ciclo de vida (Eisenback, 1988). Existem muitas dezenas de espécies identificadas, sendo 4 as mais comuns: *Meloidogyne hapla*, *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica*.

A doença causada pelo NGR é caracterizada por apresentar alterações fisiológicas e morfológicas na planta que se reflectem na parte aérea. No entanto, os sintomas característicos da doença encontram-se sobretudo na zona radicular (Agrios, 2005). As raízes infectadas pelo nemátode aumentam de volume no ponto de invasão e desenvolvem galhas características que conduzem a uma alteração do diâmetro da raiz (Agrios, 2005).



**Figura 1.1** - Fêmea de *Meloidogyne* spp. inserida na raiz e ovos (SEM). Fonte: LabMic.



**Figura 1.2** – Raiz com galhas causadas por *Meloidogyne* spp. Fonte LabMic.

O NGR é o organismo causador de uma das principais doenças que afectam os sistemas agrícolas por todo o mundo, principalmente plantas susceptíveis em climas quentes ou tropicais com invernos curtos e amenos. O NGR pode atacar mais de 2000 espécies de plantas cultivadas e pode ser responsável por 5% das perdas na produção mundial, podendo no entanto as perdas individuais serem muito superiores (Agrios, 2005). As plantas sofrem alterações visíveis

devido à acção directa do nemátode nas raízes assim como à sua própria reacção ao ataque. Como consequência de um sistema radicular debilitado, podem surgir necroses, cloroses, um menor número de folhas e flores, frutos inexistentes ou de fraca qualidade, um decréscimo da produção, crescimento lento e mesmo a morte da própria planta. As plantas afectadas também ficam mais susceptíveis a infecções causadas por outros organismos como fungos e bactérias (Agrios, 2005).

### 1.2.1 Controlo Químico vs Biológico

O controlo das plantas infectadas por NGR é muito difícil devido não só à severidade com que a doença ataca as plantas mas também pelo seu diagnóstico por vezes não ser adequado, uma vez que a sintomatologia apresentada é muito idêntica a outras doenças, pragas ou carências nutritivas (Agrios, 2005).

Estão disponíveis no mercado diversos meios de controlo contra nemátodes fitoparasitas sendo o custo, a eficácia e o tipo de cultura alguns dos factores que influenciam a escolha do produto mais adequado (Agrios, 2005).

De entre os meios de controlo mais importantes e fiáveis contra o NGR destaca-se o controlo químico, através da utilização de biocidas gerais e de nematicidas. Contudo a sua aplicação tem um impacto considerável ao nível ambiental e repercute-se na saúde humana e animal. Por outro lado o desenvolvimento de resistências por parte dos nemátodes aos pesticidas tem levado à diminuição da sua eficácia (Kerry, 2000).

Os problemas causados pela utilização do controlo químico no combate à doença têm levado ao desenvolvimento de novas técnicas para o seu combate. Como estratégias alternativas à utilização do controlo químico destacam-se os meios de

controlo culturais e biológicos. Entre os primeiros têm sido utilizados com relativo sucesso a solarização, pousio, utilização de plantas resistentes e rotação de culturas (Agrios, 2005). O controlo biológico, através da utilização de inimigos naturais desta doença, é uma forte possibilidade, uma vez que existem numerosos organismos antagonistas do NGR (Stirling, 1991).

#### **1.2.1.1 A utilização de microrganismos como agentes de controlo biológico contra nemátodes**

O estudo de organismos para utilização em controlo biológico contra nemátodes começou no século XIX, quando Kühn (1887) observou o parasitismo de uma fêmea de *Heterodera schachtii* por um fungo (Sidiqqi & Mahamood, 1996). Desde então muitos outros organismos foram referidos como parasitas de nemátodes, tais como fungos, bactérias, vírus, nemátodes predadores, insectos e alguns invertebrados (Stirling, 1991).

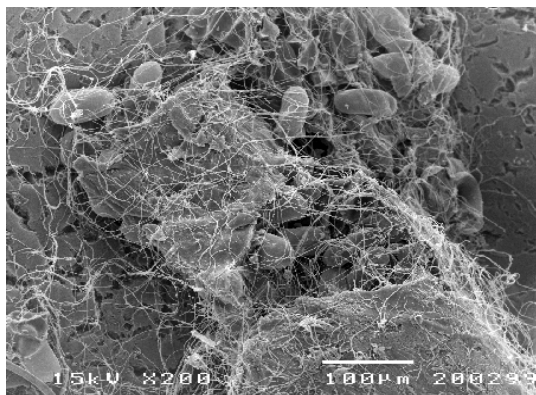
Apesar de ao longo dos anos terem sido descobertos muitos microorganismos com elevado potencial biológico contra o NGR (Sidiqqi & Mahamood, 1996), poucos têm sido suficientemente eficazes para competirem com os produtos químicos existentes no mercado (Abrantes *et al.*, 2002) não existindo, até ao momento, nenhum agente de controlo biológico contra NGR com utilização generalizada (Mayra *et al.*, 2007).

Entre os microorganismos que parasitam nemátodes, os fungos destacam-se como os que demonstram maior potencial como agentes de controlo biológico (Stirling, 1991). Os fungos nematófagos podem ser agrupados de acordo com o seu modo de acção. Existem fungos formadores de armadilhas (ex. *Arthrobotrys irregularis*, *Dactylella* spp.) (Kerry & Jaffee, 1997; Kerry, 2001; Yang *et al.*, 2007), fungos endoparasitas de formas vermiformes (ex. *Harposporium* spp. e *Drechmeria* spp.) (Nordbring-Hertz *et al.*, 2002) e fungos endoparasitas de ovos e de formas fixas de nemátodes (ex. *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia*). Estes dois últimos podem ser considerados os mais promissores no controlo desta doença (Whitehead, 1997; Kerry, 2001; Rao, 2005). Os principais mecanismos de acção dos fungos sobre os nemátodes são a danificação de elementos estruturais dos ovos e da cutícula do nemátode por actividade enzimática e/ou física e distúrbio fisiológico, através da síntese e difusão de metabolitos tóxicos (Morgan-Jones & Rodriguez-Kabana, 1987).

A fraca implementação, até ao momento, destes microrganismos como agentes de controlo biológico deve-se em parte às suas limitações, entre as quais, a lenta actuação destes organismos, dependência dos factores ambientais, ou a dificuldade em atingir a totalidade da população do patógeno (Kerry, 1987). É necessário estudar os factores químicos, físicos e biológicos que afectam o desenvolvimento do fungo no solo de forma a compreender o comportamento dos microrganismos. Uma das soluções é aumentar a virulência através de engenharia genética e assim permitir um aumento da sua eficácia no controlo biológico (Yang *et al.*, 2007).

### 1.2.2 *Pochonia chlamydosporia* como agente de controlo biológico contra NRG

O fungo *Pochonia chlamydosporia* tem a capacidade de parasitar ovos de nemátode *Meloidogyne* spp. (Stirling, 1991) sem a utilização de toxinas ou armadilhas, ao contrário do que acontece com outras espécies. Este fungo parece não ser capaz de parasitar estádios móveis



**Figura 1.3** – *P. chlamydosporia* a parasitar massa de ovos de NRG (SEM). Fonte: LabMic

(Kerry & Jaffee, 1997) não conseguindo assim, evitar a invasão das raízes pelo 2º estágio juvenil dos nemátodes (Kerry, 2000). Esta particularidade do combate ao nemátode impossibilita a utilização do fungo como controlo preventivo (de Leij *et al.*, 1992). Apesar disso, o fungo consegue diminuir significativamente a multiplicação dos nemátodes através do parasitismo dos ovos (Kerry, 2001; Franco, dados não publicados).

A maximização do controlo da multiplicação do NRG pela acção do fungo é conseguida em plantas que suportem um elevado crescimento do fungo na sua rizosfera, que produzam galhas pequenas em resposta ao desenvolvimento do nemátode, que sejam fracas hospedeiras do nemátode e quando as temperaturas de campo sejam inferiores a 30°C (Kerry, 2001).

### 1.2.2.1 Selecção da estirpe PcMR

Define-se estirpe como o isolado de um fungo em cultura pura e caracterizado taxonomicamente, que tenha características morfológicas, fisiológicas ou outras que o distinguem de outros isolados (Ulloa & Hanlin, 2000).

Existe uma grande variação de algumas características entre estirpes do fungo *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Abrantes *et al.*, 2002) o que leva, a que um pouco por todo o mundo, se procurem estirpes mais eficazes como agentes de controlo biológico (Irving & Kerry, 1986; Kerry *et al.*, 1986; Crump & Irving, 1992; Hidalgo-Diaz *et al.*, 2000).

A potencialidade das diferentes estirpes como agentes de controlo biológico varia entre si (Irving & Kerry, 1986; Kerry *et al.*, 1986; Kerry, 2001). A virulência contra o nemátode das galhas radiculares (NGR), a capacidade de colonizar a rizosfera, a produção de clamidósporos (Kerry, 2000) e a temperatura óptima (Kerry *et al.*, 1986) são características importantes para a selecção de um agente de controlo biológico.

As estirpes indígenas têm demonstrado muitas vantagens relativamente às estirpes introduzidas, uma vez que podem ser muito mais virulentas em relação às populações de nemátodes autóctones. Também podem competir mais facilmente com a microflora local, o que lhes confere uma maior adaptação às condições ambientais do local em causa (Stirling, 1991). Assim, torna-se imperativo identificar as estirpes mais adequadas às condições de cada região e que possam colonizar a rizosfera das plantas aí cultivadas (Hidalgo-Diaz, *et al.*, 2000).

No âmbito dos estudos desenvolvidos na Universidade de Évora foram obtidos, a partir de ovos de NGR, vários isolados desta espécie provenientes de diversas zonas do país. Através de testes *in vitro* e posteriormente em vaso seleccionou-se a estirpe PcMR pela sua elevada potencialidade no combate à doença. Estes testes basearam-se na capacidade de parasitismo, produção de clamidósporos e colonização da rizosfera (Esteves *et al.*, 2001; Franco *et al.*, 2001; Louro *et al.*, 2001).

Após extensivos estudos em laboratório e no campo em condições reais de culturas hortícolas comprovou-se a importância da utilização do fungo *Pochonia chlamydosporia* – estirpe PcMR no controlo do NGR (Franco *et al.*, 2004). A utilização desta estirpe como agente de controlo biológico está patenteada a nível nacional (Franco, 2006b) e está em decurso o pedido de patente internacional Franco (2005a).



### 1.3 Caracterização do fungo *Pochonia chlamydosporia*

#### 1.3.1 Classificação taxonómica

O fungo *Pochonia chlamydosporia* foi identificado pela primeira vez em 1913 por Goddard quando recolheu do seu jardim um fungo ao qual chamou de *Verticilium chlamydosporium*. Em 1966 Barron & Onions designaram o fungo por *Diheterosporia chlamydosporia*. Actualmente o nome é *Pochonia chlamydosporia*, classificação atribuída por Zare & Gams no ano 2001, tal como o nome da variedade *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Zare et al., 2001). *Pochonia chlamydosporia* designa o anamorfo do fungo, fase assexuada, que pertence ao filo Deuteromycota. Este fungo também possui uma fase sexuada ou teleomorfo, designada por *Metacordyceps chlamydosporia*, pertencente ao filo Ascomycota (Sung et al, 2007). Esta fase é pouco conhecida, existindo raras descrições (Zare et al, 2001).

Tabela 1.1 – Classificação taxonómica do fungo *Pochonia chlamydosporia* (Alexopoulos et al., 1996; Sung et al., 2007; Zare et al., 2001).

<b>Classificação Taxonómica</b>	<b>Teleomorfo (Fase sexuada)</b>	<b>Anamorfo (Fase assexuada)</b>
<b>REINO</b>	Fungi	Fungi
<b>FILO</b>	Ascomycota	Deuteromycota
<b>CLASSE</b>	Ascomycetes	Hyphomycetes
<b>ORDEM</b>	Hypocreales	Moniales
<b>FAMÍLIA</b>	Clavicipitaceae	Moniliaceae
<b>GÉNERO</b>	<i>Metacordyceps</i>	<i>Pochonia</i>
<b>ESPÉCIE</b>	<i>Metacordyceps chlamydosporia</i>	<i>Pochonia chlamydosporia</i>
<b>VARIEDADE</b>	-	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>

#### 1.3.2 Biologia do fungo

*Pochonia chlamydosporia* é um fungo endoparasita facultativo que vive no solo (Goddard, 1913) e que se encontra distribuído um pouco por todo o mundo. Já foi isolado a partir de ovos de nemátode, ovos de caracóis e de lesmas ou até mesmo de outros fungos (Kerry & Jaffee, 1997; Zare et al., 2001). Embora no geral o seu crescimento no solo seja limitado, tem a capacidade de se alimentar saprofiticamente e até mesmo colonizar a rizosfera de várias plantas (Kerry, 2001). Contudo, a colonização é mais abundante em raízes infectadas por nemátodes (Kerry, 2000). Desta forma, a sua sobrevivência não se encontra completamente dependente da presença de hospedeiros (Kerry & Jaffee, 1997).

O fungo *P. chlamydosporia* tem sido encontrado em solos supressivos de NGR e nemátodes dos quistos considerando-se que possui um potencial considerável, como agente de controlo biológico, quando introduzido em solos infestados por estas espécies (Kerry & Crump, 1977; Morgan-Jones *et al.*, 1981; Kerry *et al.*, 1982a; Kerry *et al.*, 1982b; Kerry & Crump, 1998).

### 1.3.3 Caracterização Morfológica

As hifas de *Pochonia chlamydosporia* são septadas, hialinas, e geralmente o micélio é aéreo e fino (Gams, 1988, Zare *et al.*, 2001). As colónias do fungo em meio MEA atingem entre 20 a 38 mm de diâmetro em 10 dias. Inicialmente são brancas adquirindo uma cor bege e um aspecto pulverulento que resulta da produção de clamidósporos (Zare *et al.*, 2001). A parte inferior da colónia varia entre o bege, amarelo pálido e laranja.



**Figura 1.4** – Colónia de *P.chlamydosporia* em MEA. Fonte: LabMic

Na fase assexuada conhecem-se 2 tipos de esporos, os fialósporos, designados normalmente por conídios, que surgem a partir das fialides e esporos do tipo aleuriósporos, designados geralmente por dictioclamidósporos ou clamidósporos (Gams, 1988). Neste trabalho os fialósporos são designados por conídios e os esporos do tipo aleuriósporos são designados por clamidósporos.

Os fialósporos são produzidos em hifas verticiladas (conidióforos) e possuem cerca de  $2,5-4,5 \mu\text{m} \times 1,2-2,2 \mu\text{m}$ ., apresentam forma oval ou subglobosa e superfície lisa (Zare *et al.*, 2001). Os conidióforos são postrados e produzem fiálides simples ou verticiladas com 2 ou 3 fiálides ao longo do conidióforo, ou conjuntos terminais de 4 ou 5 fiálides. São estruturas finas e tubulares com cerca de  $12-26 \mu\text{m}$  de comprimento e  $1,0-1,5 \mu\text{m}$  de diâmetro (Zare *et al.*, 2001) e possuem nas suas extremidades os fialoconídios em agregados globosos mucilaginosos (Gams, 1988; Zare *et al.*, 2001).

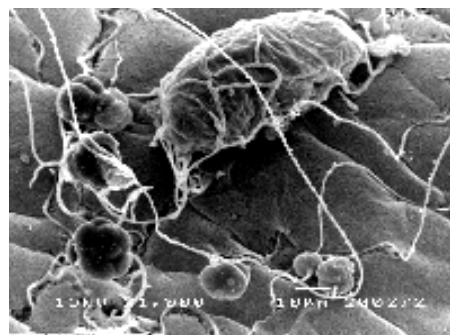
Os clamidósporos são formados a partir de uma hifa designada de pedúnculo (Gams, 1988). São formados em pequenas hastes com cerca de  $15-25 \mu\text{m}$  de comprimento e consistem numa estrutura hialina formada por um grupo de 6 a 9 células cuja parede vai espessando ao longo do tempo. Estes podem ser produzidos

em grande quantidade no micélio aéreo ou, em menor quantidade, submersos em agar (Gams, 1988; Zare *et al.*, 2001; Abrantes, *et al.*, 2002).

Os clamidósporos possuem cerca de 15-25µm de diâmetro e contêm no seu interior substâncias de reserva que lhes permitem manter-se viáveis durante mais tempo que os conídios e, conseqüentemente, sobreviver mais facilmente em condições adversas (Abrantes, *et al.*, 2002; Zare *et al.*, 2001).

### 1.3.3.1 Papel dos clamidósporos no parasitismo do NGR

A produção de clamidósporos é bastante mais baixa durante períodos em que a população de NGR é reduzida e o fungo tem de sobreviver saprofiticamente. Assim, a produção deste tipo de esporos é normalmente associada à infecção da planta por parte do nemátode (Kerry & Crump, 1998). A relação de parasitismo entre o nemátode e a planta vai induzir produção de maior quantidade de clamidósporos pelo fungo, evidenciando a importância deste tipo de esporos no processo de parasitismo do fungo sobre o nemátode (Abrantes *et al.*, 2002). O facto de o fungo produzir clamidósporos quando parasita os ovos de nemátode, leva a que a presença de raízes infectadas permita ao fungo sobreviver no solo a longo prazo (Kerry, 2001), uma vez que os clamidósporos são esporos mais resistentes que os conídios. Mesmo quando, para além do NGR, também o material orgânico disponível no solo é escasso, são os clamidósporos que permitem que o fungo sobreviva até que as condições se tornem mais favoráveis (Abrantes *et al.*, 2002).



**Figura 1.5** – *P. chlamydosporia* a parasitar ovo de NGR (SEM). Fonte: LabMic.

## 1.4 Produção do inóculo de *Pochonia chlamydosporia*

### 1.4.1 Produção de inóculo em massa

A produção de biomassa é influenciada pela estirpe e meio utilizado. Em termos gerais, um meio rico em nutrientes produz mais biomassa. Contudo, isso pode não acontecer em algumas estirpes (Olivares–Barnabeu & Lopez-Llorca, 2002). A composição do meio de cultura afecta tanto a produtividade volumétrica como o rendimento. Porém, o custo final do meio de cultura deve ser mantido o mais baixo

possível de forma a assegurar o sucesso económico do processo (Kennedy *et al.*, 1994).

Na produção em massa do inóculo, os componentes nutricionais do meio de cultura podem ser alterados de forma a favorecer a produção de propágulos, a sua estabilidade no terreno e o seu desempenho com agente de controlo biológico. Todos estes factores devem ser tidos em consideração durante a optimização do processo, uma vez que são importantes na formulação de um agente de controlo biológico com viabilidade comercial (Wraight *et al.*, 2001).

#### **1.4.1.1 Esporos como fonte de inóculo**

A utilização de fungos como agentes de controlo biológico apresenta várias vantagens. A sua capacidade de infectar e destruir o hospedeiro é certamente a sua característica mais importante. Os esporos são capazes de germinar e penetrar num hospedeiro saudável sem despoletar uma reacção de defesa (Jackson, 1997). Previsivelmente, os esporos são frequentemente utilizados como propágulos na produção de inóculo de agentes de controlo biológico.

Tal como o fungo *Pochonia chlamydosporia* também outros fungos, pertencentes à classe Hyphomycetes, apresentam diferentes tipos de esporos como é exemplo o entomopatogénico *Paecilomyces fumosoroseus*. Este fungo produz blastósporos que são muito mais efectivos no controlo biológico do que os conídios (Jackson *et al.*, 1997). Estes blastósporos para além de serem mais eficazes, apresentam velocidades de germinação muito superiores às verificadas pelos conídios na colonização da cutícula dos insectos (Vega *et al.*, 1999). A produção de blastósporos também foi estimulada em *Metarhizium* sp. de forma a produzir inóculo para bioinsecticidas (Kleespies & Zimmermann, 1998; Fargues *et al.*, 2002). Por outro lado, o fungo *Beauveria bassiana* produz, em meio líquido, blastósporos e ocasionalmente conídios submersos, mas são agora os conídios que apresentam uma série de vantagens na sua utilização como bioinsecticida (Hegedus *et al.*, 1990). Efectivamente, na natureza, os conídios são a forma mais fácil de dispersão que os fungos entomopatogénicos possuem, tanto através de insectos como através das correntes de vento (Roy *et al.*, 2001). Os conídios são também utilizados preferencialmente como inóculo de *Verticillium biguttatum* no controlo biológico de *Rhizoctonia solani* (Jager & Velvis, 1988).

Apesar dos resultados observados nos diferentes estudos de controlo biológico efectuados serem entusiasmantes, a utilização do controlo biológico em substituição de outros métodos tem sido bastante limitada (Cannayane & Jonathan, 2008). As duas principais razões para esta fraca implementação têm sido o limitado tempo de vida das formulações de fungos e os elevados custos de produção (Duan *et al.*, 2008). Alguns dos factores que afectam o tempo de vida dos esporos quando formulados são a composição nutricional do meio (Cliquet & Jackson, 1999), aditivos (Jackson *et al.*, 2006), processos de secagem (Guijarro *et al.*, 2006), temperatura,  $a_w$  e atmosfera envolvente dos esporos formulados (Duan *et al.*, 2008).

#### **1.4.1.1.1 Clamidósporos como fonte de inóculo**

Alguns dos estudos efectuados para a produção em massa de esporos têm como objectivo primordial o desenvolvimento de esporos de resistência (Wraight *et al.*, 2001).

Os clamidósporos são produzidos por muitos fungos, sendo estruturas vegetativas de parede espessada com formas muito variadas (Lin & Heitman, 2005). Os clamidósporos de *Fusarium* spp. são a principal forma de sobrevivência do fungo a longo prazo, permitindo ao fungo permanecer no solo durante as épocas desfavoráveis ao seu desenvolvimento. Consequentemente, este tipo de esporos tem um papel primordial como inóculo primário deste fungo (Couteaudier & Alabouvette, 1990; Ciotola *et al.*, 2000). Os clamidósporos de *Trichoderma* spp. também foram considerados como sendo propágulos promissores no controlo biológico contra *Rhizoctonia solani*, uma vez que sobrevivem no solo por prolongados períodos de tempo (Lewis & Papavizas, 1983).

O fungo *Pochonia chlamydosporia* produz três tipos de propágulos diferentes, fragmentos de hifas, conídios e clamidósporos. O micélio do fungo não sobrevive a temperaturas superiores a 40°C (Olivares-Bernabeu & López-Llorca, 2002) e à semelhança dos conídios é incapaz de colonizar o solo sem a ajuda de um suplemento nutritivo (de Leij *et al.*, 1992; Kerry *et al.*, 1993). A adição de nutrientes ao solo ou ao inóculo pode estimular a proliferação de microrganismos competidores e causar alterações no desenvolvimento da cultura (Kerry, 2000). Por sua vez, os clamidósporos são estruturas que possuem uma maior quantidade de substâncias de reserva o que permite a sua inoculação sem necessidade de suplementos nutritivos para que ocorra a germinação e crescimento do fungo (Kerry, 1995; Kerry,

2001; Abrantes *et al.*, 2002). Para além disso, os clamidósporos possuem paredes espessas que os tornam mais termo-resistentes que as restantes estruturas do fungo. Esta característica permite a permanência do fungo no solo e na rizosfera em épocas desfavoráveis e germinação apenas quando as condições forem mais propícias ao seu desenvolvimento (Stirling *et al.*, 1998; Abrantes *et al.*, 2002).

#### 1.4.2 Meios de cultura

A produção intensiva de propágulos de fungos pode ser conseguida através da utilização de hospedeiros vivos, da fermentação em substrato sólido e da fermentação em cultura líquida. A utilização de hospedeiros vivos é o método menos habitual, pois é também o mais dispendioso. O cultivo em substrato sólido é, muitas vezes, o método preferencial pois favorece a produção de conídios em hifas aéreas. Os esporos produzidos em meios sólidos são mais tolerantes à dessecação e mais estáveis em formulações secas, comparativamente aos esporos formados em cultura submersa. Contudo, os meios sólidos apresentam várias limitações nomeadamente no processo de *scale-up* da produção. As mais graves são as dificuldades na esterilização do substrato, o controlo da temperatura, a manutenção da cultura pura, o controlo das trocas gasosas, o tempo de fermentação, a extracção do produto e os custos do processo (Jackson, 1997).

Actualmente a produção em grande escala é geralmente conseguida através da fermentação líquida submersa (Powell, 1993). A utilização de fermentadores possui um papel bastante importante na optimização das condições de cultura, simplificando a produção e reduzindo o tempo de fermentação (Lozano-Contreras *et al.*, 2007). Este tipo de cultura permite obter um meio de crescimento homogéneo, para além de permitir controlar todos os factores que afectam o processo produtivo, tais como, temperatura, arejamento, agitação e pH (Jackson, 1997; Lozano-Contreras *et al.*, 2007). Estes factores juntamente com uma fácil recolha do produto final traduzem-se numa produção em massa facilitada e em custos de produção reduzidos (Lozano-Contreras *et al.*, 2007). Uma outra forma de cultura líquida é a cultura líquida estacionária em que os fungos formam um micélio superficial que pode esporular na sua parte superior (Carlile *et al.*, 2001). Esta parte do micélio fica exposta à atmosfera enquanto a parte inferior fica em contacto directo com o meio nutritivo, fazendo com que o crescimento celular não seja homogéneo (Gottlieb & Etten, 1966). O micélio superficial origina uma barreira que leva a que se crie, entre

a superfície do líquido e o micélio, uma zona rica em CO<sub>2</sub> e pobre em O<sub>2</sub> que dificulta o desenvolvimento do fungo (Neidleman, 1989). Este sistema apresenta algumas vantagens em relação à cultura líquida submersa, como por exemplo o facto de não haver formação de espuma no meio nem perturbação das células miceliais através de forças mecânicas. Contudo, também apresenta desvantagens, nomeadamente, períodos de incubação muito prolongados e produções reduzidas que tornam o processo caro, mais trabalhoso e com maior risco de contaminação. O controlo da temperatura, a heterogeneidade do meio por falta de agitação, o reduzido contacto entre as células e os nutrientes, a reduzida razão superfície/volume de líquido e a necessidade de áreas de grandes dimensões, são outros problemas deste tipo de fermentação (Neidleman, 1989).

A maioria dos sistemas de produção industrial de fungos utiliza um sistema de duas fases. O inóculo cresce inicialmente em cultura líquida submersa e é posteriormente transferido para o substrato sólido onde ocorre a produção de conídios aéreos (Vimala Devi & Prasad, 1994). Como exemplo, temos estudos que referenciaram a cultura bifásica como sendo a forma mais rentável de produzir esporos de *Verticillium lecanii*, uma vez que as diferenças na produção podem apresentar vantagens económicas significativas na aplicação deste fungo entomopatogénico no campo (Derakhshan *et al.*, 2008).

#### **1.4.2.1 Produção de clamidósporos de PcMR em meio líquido**

A produção em cultura líquida é a tecnologia mais eficiente para produção de microrganismos para utilização em controlo biológico (Jackson, 1997; Jackson *et al.*, 2006). O fungo *Pochonia chlamydosporia* tem sido produzido, preferencialmente, em meio sólido. Os meios mais comuns para a produção de clamidósporos deste fungo são os meios constituídos por cevada, milho ou trigo moídos com areia esterilizada (Abrantes *et al.*, 2002). Contudo, para se tornar um agente de controlo biológico com elevada viabilidade económica é necessário encontrar métodos que permitam produções elevadas de clamidósporos (Kerry *et al.*, 1993). Embora se tenham efectuado vários estudos para conseguir produzir clamidósporos em cultura líquida (Kerry *et al.*, 1993; Kerry & Jaffee, 1997; Stirling *et al.*, 1998; Liu & Chen, 2003; Mo *et al.*, 2005), só recentemente foi possível em estudos realizados no LabMic, Universidade de Évora (Alegria, 2007; Magriço, 2007; Franco *et al.*, resultados não publicados). Os trabalhos realizados comprovaram que é possível produzir

clamidósporos de PcMR em cultura líquida estacionária, em cultura líquida com arejamento e em cultura líquida com agitação magnética contínua. Para além disso foi demonstrado que o fungo cresce tanto à superfície como em cultura submersa (Alegria, 2007; Magriço, 2007; Franco *et al*, resultados não publicados). A composição do meio de cultura adequada à produção de clamidósporos em meio líquido foi resultado de uma série de estudos nutricionais. Inicialmente, colocou-se a hipótese de que o fungo produziria clamidósporos em meios de cultura que se assemelhassem às condições em que o fungo os produz na Natureza. Assim, uma vez que o fungo produz quantidades elevadas quando está na presença de ovos de nemátode, decidiu-se testar meios de cultura com ovos de galinha na sua composição (Alegria, 2007; Franco *et al*, resultados não publicados). Os resultados foram favoráveis e a partir daí foram desenhados meios sintéticos de forma a compreender a composição mais indicada para a produção deste tipo de esporos. Após vários ensaios, foi possível determinar que os nutrientes mais importantes eram as proteínas e os lípidos e que só na presença dos dois a produção de clamidósporos era possível. Foram testadas várias fontes proteicas e lipídicas e chegou-se à conclusão que embora as fontes proteicas possam ter várias origens, a fonte lipídica mais adequada é sem dúvida a lecitina (Alegria, 2007; Magriço, 2007; Franco *et al*, resultados não publicados). Para além disso, verificou-se que a presença de cálcio também é importante na produção de clamidósporos por esta estirpe (Magriço, 2007). Desta forma, definiu-se um meio constituído por **Albumina**, **Lecitina** e pela **Mistura A** de sais (**ALMA**) como sendo o mais adequado à produção deste tipo de esporos. Este meio atinge produtividade volumétricas de clamidósporos que podem variar entre  $10^5$  e  $10^6$  clamidósporos/ml. A relação de albumina e lecitina mais adequada também foi estudada e determinou-se como sendo 3,25:1 (g/g) (Magriço, 2007), a relação existente no ovo.

#### 1.4.2.2 Processos de extracção

Como referido anteriormente, os clamidósporos são estruturas preferenciais para a constituição de inóculo de *Pochonia chlamydosporia* no controlo biológico do NGR. Contudo, a sua utilização está também dependente do desenvolvimento de processos tecnológicos que permitam a sua extracção do meio de cultura, assim como a sua separação eficaz das restantes estruturas do fungo.



A filtração é um processo bastante usual na separação de partículas. Os sistemas convencionais de filtração permitem separar partículas sólidas suspensas, num líquido ou fluido, em função da dimensão das partículas. A componente líquida da suspensão passa através de uma membrana porosa que possui a capacidade de reter as partículas sólidas. A força motriz do processo pode ser a gravidade, pressão, vácuo ou força centrífuga (Grandison & Lewis, 1996).

O fungo *Pochonia chlamydosporia* produz três tipos de estruturas diferentes, hifas, conídios e clamidósporos. Uma vez que se pretende utilizar como inóculo apenas os clamidósporos, torna-se necessário separá-los das outras estruturas. Os conídios apresentam em média 2 – 4µm de dimensão, os clamidósporos apresentam dimensões bem superiores na ordem dos 15-25µm. As hifas podem apresentar dimensões muito variadas. O facto de os clamidósporos apresentarem dimensões superiores aos conídios é vantajoso do ponto de vista tecnológico, pois facilita o processo de separação (Atkins *et al.*, 2003).

No Laboratório de Micologia Aplicada, ICAAM, Universidade de Évora foi desenvolvida a tecnologia FCNUAD. Esta é uma tecnologia inovadora de microfiltração aplicada à separação de micropartículas de acordo com a sua dimensão a partir de uma suspensão. Está patenteada em Portugal (Franco & Fernandes, 2004) e recentemente foi concedida a patente internacional (Franco & Fernandes, 2009) “Method and apparatus for separation of solids in liquid suspensions, by filter unclogging aided filtration”). O desenvolvimento da tecnologia teve como primeiro objectivo a extracção de esporos do fungo *Pochonia chlamydosporia* de suspensões do meio sólido de cultura, podendo ser aplicada a outros tipos de suspensões, inclusive a meios líquidos.

### **1.4.3 Nutrição do fungo vs Esporulação**

Ao longo dos anos têm surgido vários estudos no sentido de encontrar ingredientes acessíveis para utilizar nos meios de cultura de agentes de controlo biológico. Contudo, de forma a melhorar a produção em massa e acelerar a comercialização, é extremamente importante entender as necessidades nutricionais dos fungos (Sun & Liu, 2006).

O desenvolvimento de um meio nutritivo para a produção de um agente de controlo biológico tem de permitir um bom crescimento vegetativo e formação de propágulos (Jackson, 1997). Geralmente, a produção de esporos depende da

formação de grandes quantidades de biomassa. Uma das razões para que isso aconteça é o facto de a esporulação estar dependente de nutrientes endógenos que são acumulados durante o crescimento vegetativo (Jackson, 1997). Contudo, estudos efectuados com o fungo *Talaromyces flavus* verificaram que o aumento de biomassa nos diferentes meios testados, não resulta necessariamente no aumento da produção de esporos. Pelo contrário, algumas fontes de carbono e azoto demonstravam uma relação inversa entre a produção de biomassa e de esporos (Jackson, 1997).

Factores nutricionais tais como a fonte de carbono, fonte de azoto, elementos vestigiais, vitaminas e razão carbono/azoto podem influenciar o crescimento e formação de propágulos dos agentes de controlo biológico, assim como a sua eficácia (Jackson, 1997; Wraight *et al.*, 2001).

#### **1.4.3.1 Fontes de carbono**

Os fungos podem utilizar como fontes de carbono um enorme conjunto de compostos orgânicos tais como, hidratos de carbono, ácidos orgânicos, álcoois, lípidos, aminoácidos e proteínas (Deacon, 1997). Os hidratos de carbono são uma importante fonte de energia, pois podem funcionar como moléculas estruturais da parede celular e componentes de numerosos precursores metabólicos. São as moléculas orgânicas mais abundantes na natureza, sendo que metade do carbono orgânico se encontra nestas moléculas (Mckee & Mckee, 1999).

A glucose, monossacárido que funciona como unidade estrutural de muitos hidratos de carbonos, possui por isso uma importância central no metabolismo. Outros açúcares podem também servir de fonte de carbono para os fungos, dependendo a sua utilização do local onde se inserem e do seu tipo de alimentação (Carlile *et al.*, 2001). Muitos fungos produzem enzimas extracelulares capazes de degradar os mais variados polissacáridos desde o amido, a lenhina, a celulose ou mesmo a quitina. Estas enzimas permitem ainda a hidrólise de lípidos, fosfolípidos e ácidos gordos que podem assim ser facilmente assimilados (Carlile *et al.*, 2001).

Embora a produção de esporos seja geralmente elevada em meios com polissacáridos, esse efeito não foi observado no desenvolvimento do fungo *Talaromyces flavus* (Engelkes *et al.*, 1997). Outros fungos produzem quantidades de esporos semelhantes para a maioria das fontes de hidratos de carbono. Um exemplo é o fungo *Paecilomyces fumosoroseus* que embora cresça melhor com glucose,

produz quantidades semelhantes de blastósporos na maioria dos outros hidratos de carbono testados (Cliquet & Jackson, 1999). Por outro lado, no fungo *Metarhizium flavoride* a produção de blastosporos é favorecida na presença de sacarose em comparação com frutose e glucose (Issaly *et al.*, 2005). O fungo *Beauveria brassiana* produz grandes quantidades de conídios na presença de glucose, enquanto na presença de outras fontes de carbono, produz igualmente conídios e blastósporos (Thomas *et al.*, 1987). A fonte de carbono mostrou ter um forte impacto na formação de conídios e microesclerotos do fungo *Colletotrichum truncatum* em cultura submersa (Jackson & Bohthast, 1990). O efeito de vários hidratos de carbono no desenvolvimento do fungo *Pochonia chlamydosporia* também já foi estudado (Liu & Chen, 2003; Mo *et al.*, 2005). Com 18 hidratos de carbono diferentes em cultura líquida, verificou-se em todos eles a indução de crescimento mas não da produção de clamidósporos (Liu & Chen, 2003).

#### 1.4.3.2 Fontes de azoto

O azoto é o elemento essencial que pode ser encontrado em proteínas e ácidos nucleicos, entre muitas outras moléculas biológicas. Apesar da sua importância para os organismos vivos, as suas formas disponíveis são escassas. Existem microrganismos que conseguem fazer a fixação do azoto gasoso ( $N_2$ ), conseguem reduzi-lo a amónia ( $NH_4^+$ ). É a amónia e o seu produto de oxidação, o nitrato ( $NO_3^-$ ), que as plantas e os microrganismos conseguem absorver preferencialmente e utilizar à posteriori na síntese de compostos azotados (Prescot *et al.*, 1996).

As fontes de azoto mais utilizadas são o nitrato e a amónia, as amidas, as aminas, os aminoácidos, os polipéptidos e as proteínas. Muitos fungos conseguem utilizar o nitrato como fonte de azoto, que é muito comum nos solos. Apesar do mecanismo de entrada do nitrato nas células não ser bem claro, a entrada verifica-se sobretudo por difusão, quando se encontra em grandes quantidades no meio, e por transporte activo quando existe em baixas concentrações. Por reacções enzimáticas a amónia é convertida em ácido glutâmico ou glutamina que sofrem transaminação e dão origem a outros aminoácidos. A amónia é o maior regulador da assimilação do azoto, e na sua presença a assimilação de nitrato, aminoácidos e proteínas é suprimida. Os aminoácidos e péptidos de pequenas dimensões são transportados para o interior das células através de uma série de péptido-permeases, sendo posteriormente hidrolisados por peptidases intracelulares. Por outro lado os péptidos

de maiores dimensões e proteínas são degradados por hidrólise enzimática por peptidases e proteases extracelulares para posterior assimilação (Carlile *et al.*, 2001).

Em meio sintéticos, o nitrato é normalmente fornecido como sal de sódio, potássio ou amónio e diferentes sais de amónio são utilizados como fonte de amónia (Prescot *et al.*, 1996). A caseína hidrolisada também é muito usada em meios sintéticos, uma vez que contém todos os aminoácidos à excepção do triptofano, que se perde durante o processo de hidrólise ácida (Carlile *et al.*, 2001).

Embora se saiba que a fonte de azoto possa afectar o crescimento e a esporulação de vários fungos, é sabido que isso está dependente do fungo em causa. O fungo *Paecilomyces fumosoroseus* produziu maior quantidade de blastósporos em meios de cultura com aspartato ou glutamato em comparação com meios que continham casaminoácidos como fonte de azoto (Cliquet & Jackson, 1999). Por outro lado, à excepção dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, a esporulação de *Colletotrichum truncatum* é inibida por quase todos os aminoácidos estudados (Jackson & Slininger, 1993).

É de conhecimento geral que a fonte de azoto influencia a germinação de conídios e que estão envolvidos vários aminoácidos nesse processo (Barnes *et al.*, 1975; Lovett, 1976). Estudos mais recentes demonstraram que a fonte de azoto afecta a conidínogénese de *Colletotrichum truncatum*, sendo que níveis reduzidos de cisteína, metionina, lisina e triptofano permitem a formação rápida de um número elevado de conídios (Jackson & Slininger, 1993).

O fungo *Pochonia chlamydosporia* desenvolve-se bem utilizando diferentes fontes de azoto. Em cultura sólida observa-se um maior crescimento micelial na presença de caseína e na presença de peptona no caso da cultura líquida (Liu & Chen, 2003). Em termos de esporulação de conídios em cultura líquida, a produção é superior na presença de peptona de caseína, caseína e peptona em comparação com  $\text{NaNO}_3$  (Mo *et al.*, 2005).

#### **1.4.3.3 Razão carbono/azoto (C:N)**

O azoto é necessário para a síntese de muitos constituintes celulares, enquanto o carbono é uma fonte energética. Um meio equilibrado deve conter dez vezes mais carbono que azoto. Uma razão de C:N de 10:1, ou menos, irá permitir um conteúdo celular elevado. Contudo, rácios mais elevados na ordem dos 50:1 permitem a

acumulação de álcool, metabolitos secundários derivados do acetato, lípidos ou polissacáridos extracelulares. Encontrar a razão adequada de C:N para cada fermentação é extremamente importante (Carlile *et al.*, 2001). O rácio C:N também afecta a produção de esporos e de biomassa, sendo que em termos gerais um rácio mais elevado permite um aumento da esporulação do fungo *Talaromyces flavus*. Por outro lado, leva a uma diminuição ou a uma manutenção do seu peso seco, dependendo da fonte de carbono utilizado no desenvolvimento do fungo (Engelkes *et al.*, 1997).

Estudos efectuados por Mo *et al.* (2005) sugerem que a razão C:N de 10:1 é a mais favorável para a produção de propágulos, hifas e conídios, de *Pochonia chlamydosporia* em cultura líquida. No LabMic não foi estudado a razão C:N, porque a forma de azoto presente no meio de cultura é mais importante que este parâmetro (Franco *et al.*, resultados não publicados) .

#### 1.4.3.4 Outros Nutrientes

O carbono (C), o hidrogénio (H), o oxigénio (O), o azoto (N), o enxofre (S), o fósforo (P), o magnésio (Mg) e o potássio (K) são elementos necessários a todos os organismos em grandes quantidades. Os três primeiros (C, H e O) são obtidos a partir de compostos orgânicos. Os restantes quatro (S, P, Mg e K) podem obtidos principalmente através de sais (Carlile *et al.*, 2001).

Os microelementos ferro, cobre, cálcio, manganês, zinco e molibedénio são necessários a todos, ou quase todos os microrganismos, nomeadamente como co-factores de enzimas ou de proteínas. Contudo, as quantidades necessárias são bastante reduzidas. As vitaminas são substâncias essenciais para a sobrevivência dos fungos, embora também sejam necessárias em quantidades muito reduzidas (Carlile *et al.*, 2001).

De todos os microelementos testados, o zinco foi o único que se mostrou como essencial ao crescimento e esporulação adequados do fungo *Paecilomyces fumosoroseus*. As vitaminas não se revelaram necessárias ao crescimento nem à esporulação deste fungo (Cliquet & Jackson, 1999). Por outro lado, a biotina mostrou ser um requerimento nutricional bastante importante para o crescimento do fungo *Verticillium biguttatum* (Van Den Boogert, 1989).

As vitaminas têm um efeito limitante no crescimento do fungo *Pochonia chlamydosporia* tanto em meio sólido como em meio líquido. A ausência da vitamina B6 no meio de cultura diminui a produção de conídios pelo fungo (Liu & Chen, 2003).

### 1.5 Objectivos

Para que o fungo *Pochonia chlamydosporia* seja eficaz na luta contra NGR, é necessário inocular o solo com 5000 clamidósporos por grama de solo (de Leij *et al.*, 1992). A aplicação no solo destas quantidades de clamidósporos, em larga escala, depende da existência de uma metodologia rápida e eficiente de produção e formulação de clamidósporos. Esta deverá ser de baixo custo de modo a permitir a utilização do fungo sob a forma de um produto comercial competitivo com os restantes produtos existentes no mercado (Abrantes *et al.*, 2002). Contudo, a metodologia utilizada até ao momento para a produção do fungo tem sido a fermentação em meio sólido, o que torna o processo ineficiente e caro (Stirling *et al.*, 1998). Os trabalhos desenvolvidos no laboratório de Micologia Aplicada da Universidade de Évora, propõem-se a produzir *Pochonia chlamydosporia* em meio líquido de forma a alcançar rapidamente os níveis de produção desejados a custos economicamente favoráveis. Este trabalho teve como objectivo contribuir para a optimização da produção de clamidósporos em meio líquido para permitir a utilização industrial da estirpe PcMR do fungo *Pochonia chlamydosporia*.

Com este trabalho pretende-se estudar a importância dos hidratos de carbono e lípidos no peso seco e produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia*, e determinar aspectos relevantes do desenvolvimento do fungo como a curva de produção de clamidósporos.

Tendo em consideração os aspectos referidos anteriormente, foram delineados os seguintes objectivos:

- Estudar o efeito de hidratos de carbono na produção de clamidósporos e na obtenção de peso seco de PcMR.
  - Determinar o papel da glucose, sacarose e amido no crescimento do fungo comparativamente à utilização da composição do meio base ALMA.
  - Determinar o papel da glucose, sacarose e amido na produção de clamidósporos comparativamente ao meio base ALMA.

- Estudar o efeito da substituição da lecitina no meio base ALMA por outros lípidos na produção de clamidósporos e peso seco de *Pochonia chlamydosporia*, sendo estes dois ácidos gordos insaturados (oleico e linoleico), dois ácidos gordos saturados (esteárico e palmítico) ou misturas dos anteriores e ainda três triglicéridos (trioleato, tripalmitato e óleo de girassol).
  - Testar variações nas concentrações de ácido oleico e palmítico.
- Determinar a curva de crescimento do fungo *Pochonia chlamydosporia* nos meios ALMA, ALMA +5g de glucose e ALMA +15g de glucose
- Determinar a produção de clamidósporos e peso seco em função do tempo.
- Determinar o consumo dos nutrientes (albumina, lecitina e glucose) em função do tempo.
- Determinar a relação entre a taxa de crescimento do fungo e a produção de clamidósporos.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Delineamento experimental

Na figura 2.1 encontra-se o delineamento experimental seguida ao longo deste trabalho.

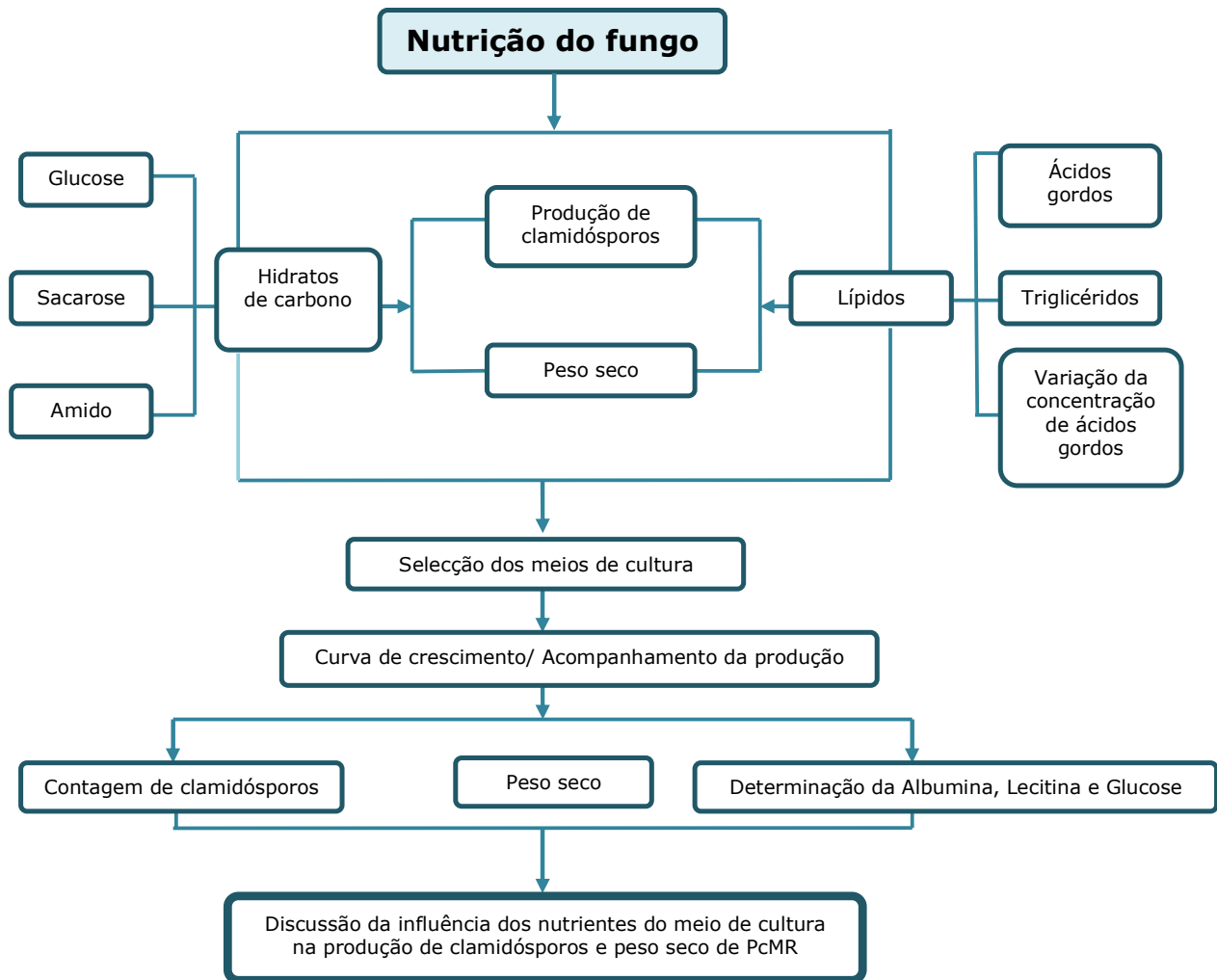


Figura 2.1 – Delineamento experimental

## 2.2 Procedimentos experimentais

### 2.2.1 Microrganismos e meios de cultura

#### 2.2.1.1 Estirpe PcMR

Todos os ensaios tiveram como inóculo o fungo *Pochonia chlamydosporia*, estirpe PcMR. Esta estirpe foi isolada e seleccionada em Portugal a partir de ovos de *Meloidogyne* spp. e actualmente faz parte da colecção de fungos do Laboratório de Micologia Aplicada, ICAAM, da Universidade de Évora. A sua utilização como agente



de controlo biológico está sujeita à patente nacional (Franco, 2006b), e está em curso o pedido de patente internacional (Franco, 2005a).

A manutenção da estirpe é efectuada em placas de Corn Meal Agar (CMA) (Himedia) à temperatura de 25°C. Após repicagem, o fungo deve crescer pelo menos duas semanas antes de as placas serem utilizadas.

#### **2.2.1.2 Preparação do inóculo**

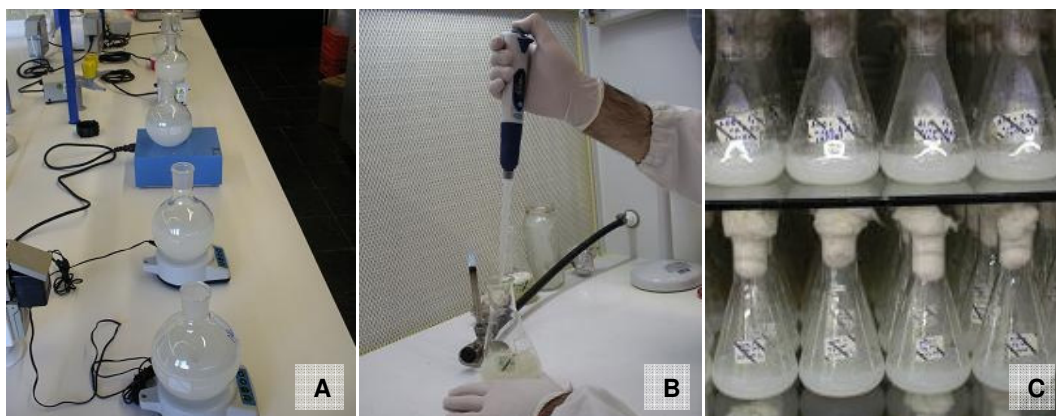
Como inóculo foram utilizados, em todos os ensaios, 5 ml de meio Czapek colonizado com PcMR. Para a elaboração do inóculo, o meio Czapek Dox Broth (Thom & Raper, 1945) foi preparado e transferido para Erlenmeyers de 250 ml na quantidade de 200 ml por frasco. Os Erlenmeyers foram selados com rolhas de algodão e papel de alumínio e esterilizados em autoclave a 121°C durante 40 minutos. Após a esterilização do meio, inocula-se com 8 “plugs” de 0.5mm de diâmetro de CMA colonizado na câmara de fluxo laminar. O fungo deve crescer 12 dias a 25°C para que o inóculo possa ser utilizado. Ensaios prévios determinaram que não devem ser utilizados inóculos com mais idade, uma vez que o risco de contaminação em meio líquido é elevado.

#### **2.2.1.3 Meio de cultura ALMA**

Ensaios anteriores realizados no LabMic definiram o meio ALMA como sendo adequado à produção de clamidósporos pelo fungo *Pochonia chlamydosporia*. A utilização industrial deste meio para a produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* está patenteada em Portugal (Franco, 2005b)) e em processo de patente internacional (Franco, 2006a). Este meio é constituído por uma parte orgânica e uma parte mineral. A parte orgânica é constituída por 3,25g/L de albumina de clara de ovo (Sigma) e 1g/L de lecitina de soja (grau de cozinha). A parte mineral, denominada de mistura de sais API, é constituída por 1,52 g/L de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Prolabo), 0,48g/L de NaCl (Fluka), 1,00g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Fluka), 1,20 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Panreac), 0,02g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma) e 0,30g/L KOH (Merck).

A preparação do meio é executada em duas partes. Inicialmente pesam-se os reagentes orgânicos e transferem-se para um balão volumétrico com água destilada e só posteriormente é adicionada a mistura de sais previamente preparada. Este procedimento facilita a preparação do meio e evita a coagulação da albumina, uma vez que a sua dissolução no meio de cultura é facilitada pela acção emulsionante da

lecitina (Figura 2.2A). Após a sua preparação, o meio é distribuído por Erlenmeyers de 250ml na quantidade de 100 ml em cada frasco. Os Erlenmeyers foram selados com rolhas de algodão e papel de alumínio e esterilizados em autoclave a 121°C durante 40 minutos. Na câmara de fluxo laminar, os frascos foram inoculados com 5ml de inóculo (Figura 2.2B). Efectuaram-se 5 réplicas. Os frascos são incubados a 25°C durante 30 dias em cultura estacionária (Figura 2.2C).

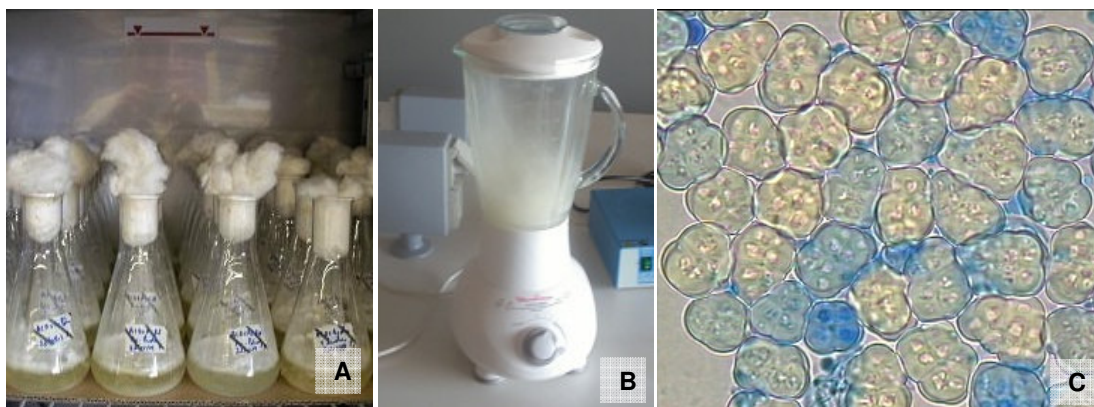


**Figura 2.2** – Método de preparação do meio ALMA para produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia*. Preparação dos meios (A), inoculação dos meios (B) e incubação na câmara de crescimento (C).

## 2.2.2 Parâmetros de análise

### 2.2.2.1 Contagem dos clamidósporos

Após os trinta dias de cultura estacionária (figura 2.3A), o volume total da cultura é transferido para os tubos de centrifuga (Sorvall RC-5B, Dupont Instruments) e centrifugado a 14680G durante 15 minutos. O sobrenadante é desprezado e o sedimento é ressuspendido com 200 ml de água destilada com a ajuda de uma vareta e vidro. A suspensão é transferida para o liquidificador Moulinex, de 600w, e liquidificado durante 1 minuto (Figura 2.3B). A contagem dos clamidósporos é feita com a ajuda de uma câmara de contagem Fuchs-Rosenthal e de um microscópio óptico (Fig. 2.3C). Efectuaram-se 6 contagens por frasco.



**Figura 2.3** – Método quantitativo da produção de clamidósporos. Fungo com 30 dias de desenvolvimento (A), liquidificação (B) e clamidósporos observados ao MOC (C).

Após a contagem dos clamidósporos, os resultados são avaliados através da produção de clamidósporos em função do volume de meio de cultura, produtividade volumétrica, e da produção de clamidósporos em função do peso seco.

#### **2.2.2.2 Determinação do peso seco**

O peso seco foi determinado utilizando o meio resultante da homogeneização para a contagem de clamidósporos. Após a homogeneização, foram transferidos 10ml para uma taça de alumínio. A secagem foi feita em estufa a 85°C durante 24h, ou até peso constante. Para cada um dos frascos foram efectuadas 3 contagens.

O valor do peso seco é o parâmetro que mede a massa total (biomassa+clamidósporos) do fungo e é sempre apresentado em função do volume do meio de cultura.

#### **2.2.2.3 Determinação dos Nutrientes**

Na determinação da quantidade de albumina, lecitina e glucose foram utilizados métodos colorimétricos. As amostras utilizadas nesta determinação foram recolhidas nos diversos períodos de cultura, antes de qualquer outro procedimento. Desta forma, evita-se que o conteúdo celular do fungo introduza erros nas determinações. Recolheram-se 5ml de cada uma das réplicas para frascos Mackartney e armazenaram-se no frio (0 – 4°C) durante 24h. Para retirar hifas e outras partículas em suspensão que poderiam interferir com a leitura, as amostras foram filtradas (mesh 75µm).

### 2.2.2.3.1 Albumina

A concentração de albumina foi determinada através de uma adaptação do método colorimétrico do Bromocresol verde (Kamphuis *et al.*, 2001). Inicialmente foi traçada uma curva de calibração para posterior comparação com as amostras (figura 2.4). Foram adicionados 100µl de amostra ou de padrão a 1mL de solução de trabalho e deixou-se a incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente. Foi medida a absorvência a 620nm num espectrofotómetro Beckam DU®530 Life Science UV/Vis. Como branco utilizou-se a solução de trabalho com água destilada. A solução de trabalho é constituída por 1 volume de Bromocresol verde 0,58mmol/L e 3 volumes de tampão succinato 0,1mol/L pH 4,0. O tampão succinato foi preparado com Brij35 (Sigma) para aumentar a especificidade da solução. Foram efectuadas 3 réplicas por amostra e 4 réplicas por padrão.

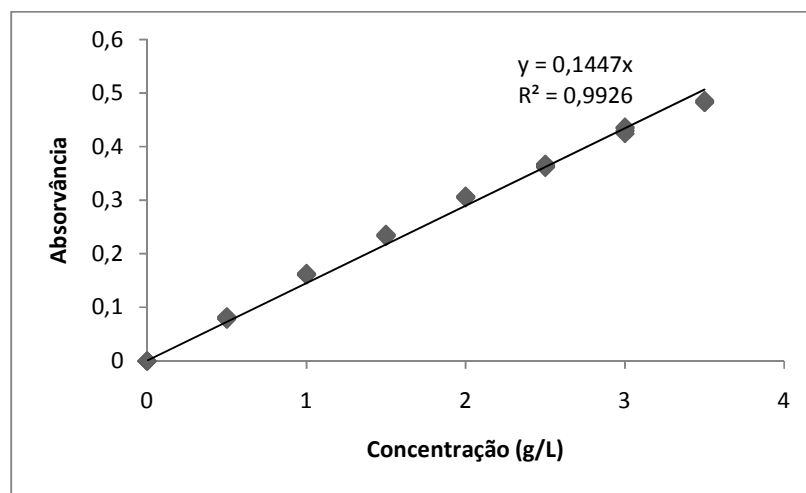


Figura 2.4 – Curva de calibração da albumina.

### 2.2.2.3.2 Lecitina

A concentração de lecitina foi determinada através de uma modificação do método de Stewart (Stewart, 1994). Foram adicionados 100µl de amostra ou de padrão a um microtubo com 1mL de clorofórmio e 1mL de ferriotiocianato de amónio. Foi efectuada uma curva de calibração com padrões de concentração conhecida (figura 2.5). Os microtubos foram agitados vigorosamente durante 1 minuto no vortex. De seguida foram centrifugados durante 5 minutos a 100G na microcentrífuga (Hettich- Mikro 200). Após a centrifugação são visíveis 2 camadas, uma inferior de clorofórmio e outra superior de ferriotiocianato de amónio (Fig. 3.5B). Esta última foi removida e a inferior foi utilizada para medir a absorvência a 488nm

no espectrofotômetro Beckam<sup>®</sup> DU<sup>®</sup>530 Life Science UV/Vis. O branco foi preparado da mesma forma que as amostras, usando água destilada em substituição da amostra. Para preparar a solução de ferriotiocianato de amônio 0,10 N dissolveram-se 16,20g de cloreto de ferro hexahidratado (Sigma) e 30,40g de tiocianato de amônio (Acros Organics) para 1l de água destilada. Foram efectuadas 3 réplicas por amostra e 4 réplicas por padrão.

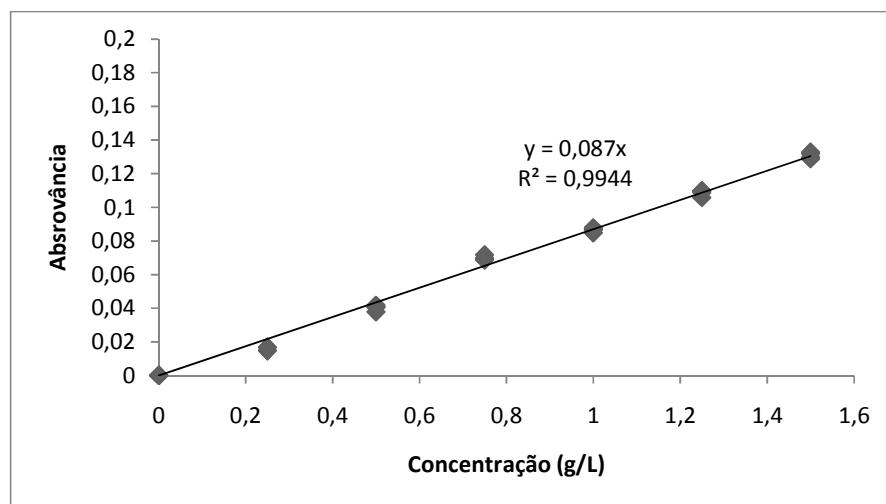


Figura 2.5 – Curva de calibração da lecitina.

#### 2.2.2.3.2 Glucose

A determinação da concentração de glucose nas amostras foi efectuada através de uma modificação do método do DNS (Miller, 1959). Foi efectuada uma curva de calibração com padrões de concentrações conhecidas (figura 2.6). Adicionou-se 1ml de amostra ou padrão a um microtubo que continha um 1ml de solução de ácido dinitrosalicílico (DNS). Os microtubos foram aquecidos em banho-maria a 80°C durante 15 minutos. Depois de arrefecer, mediu-se a sua absorvância a 540nm no espectrofotômetro Beckam<sup>®</sup> DU<sup>®</sup>530 Life Science UV/Vis. O branco foi preparado da mesma forma das amostras, utilizando água destilada. Na preparação da solução de DNS adicionaram-se 10,00g de ácido dinitrosalicílico (Acros Organics), 0,50g de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (Alfa Aesar), 10,00g de NaOH (Sigma) e ajustou-se o volume para 1L de H<sub>2</sub>O.

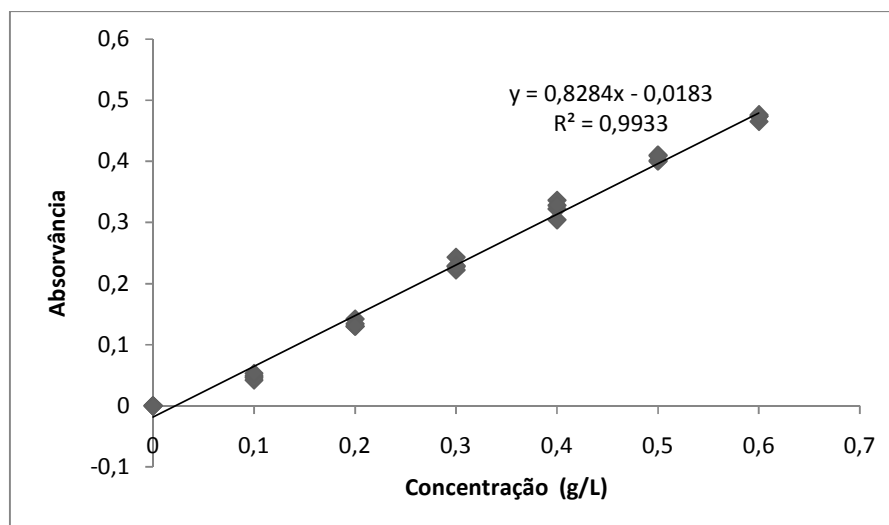


Figura 2.6 – Curva de calibração da glucose.

### 2.2.3 Estudos de avaliação da importância dos nutrientes

O meio ALMA foi definido em estudos anteriormente efectuados no LabMic como sendo um meio de cultura adequado à produção de clamidósporos do fungo *Pochonia chlamydosporia*, estirpe PcMR. Contudo, o processo de “scale-up” exige uma optimização do meio e essa optimização passa necessariamente por conhecer a acção dos diferentes constituintes do meio na produção de clamidósporos. Com esse intuito foram efectuados, neste trabalho, uma série de ensaios no sentido de perceber quais os nutrientes que favorecem a produção de clamidósporos e um outro ensaio cujo objectivo foi acompanhar o crescimento do fungo, a sua produção de clamidósporos, assim como o consumo dos principais nutrientes do meio de cultura. Todos os ensaios da avaliação da importância dos nutrientes foram repetidos 3 vezes.

#### 2.2.3.1 Alteração dos constituintes do meio de cultura

##### 2.2.3.1.1 Hidratos de carbono

Para determinar o efeito da adição de hidratos de carbono ao meio ALMA foram testados três hidratos de carbono diferentes, glucose (Prolabo), sacarose (Fisher Scientific) e amido (Sigma). Cada hidrato de carbono foi adicionado ao meio base ALMA na concentração de 2, 5, 10, 15, 30 e 50g/L. O meio ALMA foi utilizado como controlo positivo e o meio API-30g foi utilizado como controlo negativo. O meio API-30g é constituído pela mistura de sais API mais 30g por litro de hidrato de carbono.

### **2.2.3.1.2 Lípidos**

#### **2.2.3.1.2.1 Substituição da lecitina**

No meio ALMA a lecitina foi substituída por diferentes ácidos gordos saturados e insaturados, triglicéridos heterogêneos e homogêneos. Em cada meio foi utilizado 1g/L de cada um dos ácidos gordos: ácido esteárico (Fluka), ácido palmítico (Alfa Aesar), ácido oleico e ácido linoleico (Alfa Aesar) ou de cada um dos triglicéridos: trioleato (Acros Organics), tripalmitato (Alfa Aesar), óleo de girassol 100% (Grau de cozinha). Foram também testadas misturas de lípidos, em que a lecitina foi substituída por cada uma das seguintes formulações (0,50g/L + 0,50g/L): ácido esteárico e ácido palmítico, ácido esteárico e ácido oleico, ácido esteárico e ácido linoleico, ácido palmítico e ácido oleico, ácido palmítico e ácido linoleico, ácido oleico e ácido linoleico.

Uma vez que os lípidos são imiscíveis com a água, houve necessidade de fazer uma mistura prévia com a albumina e só depois adicionar à água destilada. Em todos os ensaios foi utilizado o meio ALMA como controlo positivo e os meios API-30g e AMA como controlos negativos. O meio AMA é semelhante ao meio ALMA, mas não tem lecitina na sua constituição.

Os meios testados tinham na sua composição glucose na concentração de 5g/L à excepção do controlo negativo que tem 30g (API-30g).

#### **2.2.3.1.2.2 Aumento da concentração de ácidos gordos**

A variação da concentração de ácidos dos gordos foi testada utilizando concentrações crescentes de ácidos gordos em substituição da lecitina no meio ALMA (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1g/L). Para este ensaio foi escolhido um ácido gordo saturado, o ácido palmítico, e um ácido gordo insaturado, o ácido oleico. Como controlo positivo foi utilizado o meio ALMA e como controlo negativo o meio AMA e o meio API-30g. Os meios testados tinham na sua composição glucose na concentração de 5g/L à excepção do controlo negativo que tem 30g (API-30g).

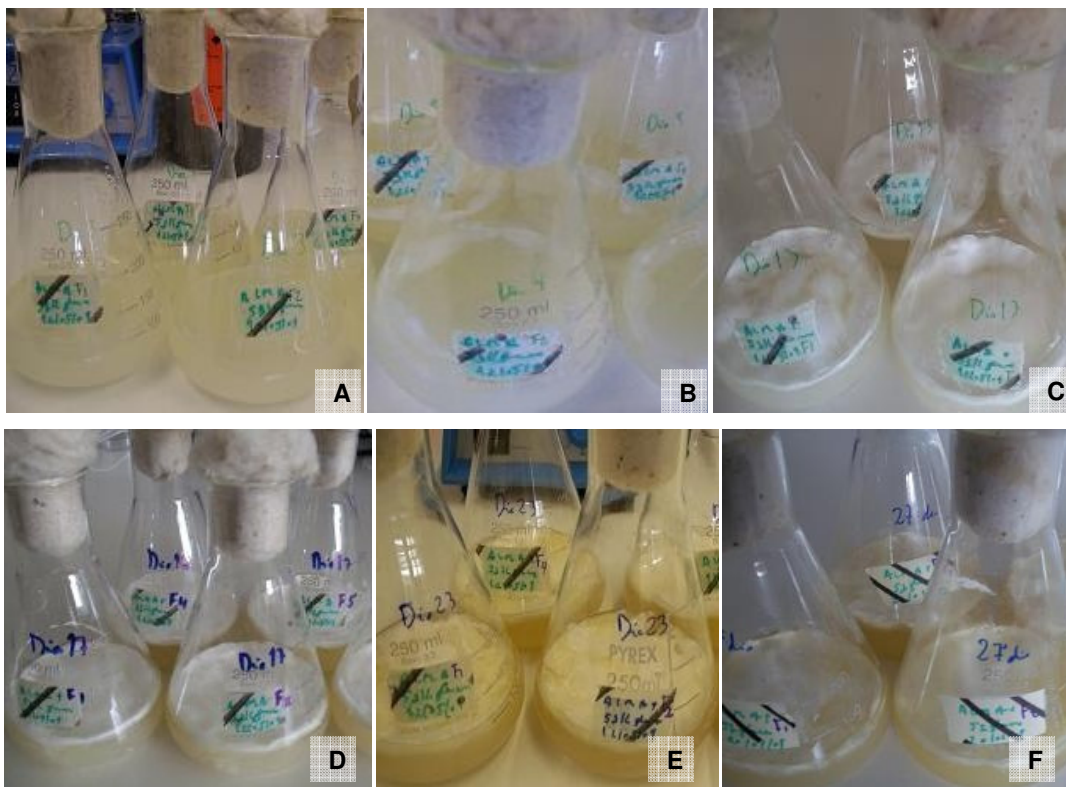
### **2.2.3.2 Curvas de crescimento**

Para além do estudo da influência de vários nutrientes no meio de cultura, pretende-se com este trabalho acompanhar o crescimento do fungo, a sua produção de clamidósporos, assim como o consumo dos principais nutrientes do meio de cultura durante os 30 dias de cultura.

O desenvolvimento do fungo, em todos os meios, foi acompanhado ao longo dos 30 dias da cultura estacionária, em 16 datas previamente determinadas. As datas seleccionadas foram o dia de inoculação, o 3º dia de fermentação, data a partir do qual forma recolhidas amostras 2 em 2 dias, até ao 27º dia, sendo a última amostra recolhida ao 30º dia do processo fermentativo.

Foram efectuadas 4 curvas de crescimento: uma no meio ALMA, duas no meio ALMA + 5g de glucose e outra no meio ALMA + 15g de glucose. Em cada um dos 16 dias seleccionados, foram recolhidas amostras de 5 réplicas.

A determinação do peso seco foi efectuada como foi descrito anteriormente, à excepção da centrifugação inicial em que a biomassa foi separada da fracção líquida. Esta etapa não pode ser realizada uma vez que a albumina coagulada podia precipitar e conduzir a falsos resultados, nomeadamente nos primeiros dias de cultura. Assim, o volume adicionado de água destilada antes de liquidificar foi de apenas 100 ml. Para além disso, o peso seco é calculado pela diferença entre o peso total lido após a secagem e a quantidade de nutrientes existentes no meio, determinada anteriormente por métodos colorimétricos.



**Figura 2.7** – Evolução do fungo no meio ALMA + 5g de Glucose. Fungo com 3 dias (A), 9 dias (B), 13 dias (C), 17 dias (D), 23 dias (E), 27 dias (F).



Os resultados da curva de crescimento foram avaliados através da análise do peso seco, da produtividade volumétrica de clamidósporos e da produção de clamidósporos em função do peso seco. Para além disso foi calculado o rendimento do substrato em clamidósporos e o rendimento do substrato em peso seco.

#### 2.2.4 Análise estatística

Para efectuar o tratamento estatístico dos dados obtidos neste trabalho recorreu-se ao programa de análise estatística SPSS<sup>®</sup> versão 17.0 para Microsoft<sup>®</sup> Windows<sup>®</sup>. Utilizaram-se diferentes testes estatísticos de acordo com o delineamento experimental do trabalho e os objectivos propostos.

A análise univariada foi utilizada para verificar a existência de diferenças entre as variâncias dos diferentes meios de cultura (variável dependente) e os respectivos valores de produção de clamidósporos e peso seco obtidos (variável dependente). Após realizada a análise univariada foram aplicados os testes (testes post-hoc) de Duncan e Tamhane's T2 sempre que foi necessário identificar as diferenças existentes entre os valores dos meios de cultura que possuíam variâncias significativamente diferentes. Utilizou-se o teste Duncan sempre que se verificou homogeneidade das variâncias e o Teste Tamhane's T2 quando esta situação não se observou. Utilizou-se o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias entre os vários meios de cultura (Snedecor *et al.*, 1980).

Foi utilizado o teste t-student para a comparação de médias de amostras emparelhadas sempre que foi necessário comparar grupos de valores de duas variáveis dependentes agrupadas de acordo com os ensaios da variável independente. Este teste foi efectuado para comparar os diferentes hidratos de carbono entre si em cada uma das concentrações testadas.

A correlação mede o grau de relacionamento entre dois grupos de dados numa escala que os torna independentes da unidade de medida e foi utilizada quando se suspeitou da existência de uma relação entre dois grupos de variáveis dependentes (Snedecor *et al.*, 1980), nomeadamente entre os valores da produção de clamidósporos e peso seco de *P. chlamydosporia* para os diferentes hidratos de carbono testados e respectivas concentrações.

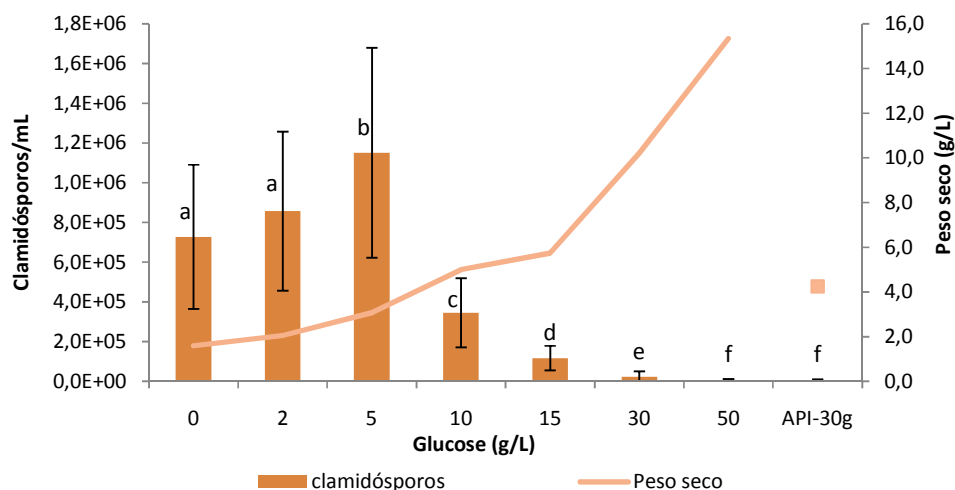
### 3. Estudo dos hidratos de carbono e lípidos

Neste trabalho, todos os testes foram realizados tendo como base o meio de cultura ALMA. Este meio foi definido em trabalhos anteriores como sendo adequado à produção de clamidósporos pela estirpe PcMR em cultura estacionária (Magriço, 2007). No presente ponto do trabalho foram efectuados testes de adição de hidratos de carbono e substituição de lípidos de forma a estudar o seu efeito na produção de clamidósporos e peso seco de PcMR em cultura líquida estacionária.

#### 3.1 Efeito dos Hidratos de carbono na produção de clamidósporos e peso seco de PcMR – Resultados e discussão

Os hidratos de carbono testados foram a glucose, a sacarose e o amido. Cada um deles foi adicionado ao meio ALMA em concentrações crescentes que variaram de 0 a 50g/L. Nas figuras 3.1, 3.3 e 3.5 são apresentados os valores de produtividade volumétrica de clamidósporos e de peso seco. Nas figuras 3.2, 3.4 e 3.6 estão representados os resultados da produção de clamidósporos em função do peso seco do fungo.

Nas condições de cultura do teste, os vários hidratos de carbono apresentaram um comportamento semelhante. Quando se fez variar a concentração de glucose (figura 3.1), observou-se que a produtividade volumétrica de clamidósporos e o peso seco, foram significativamente afectados ( $P < 0,05$ ).

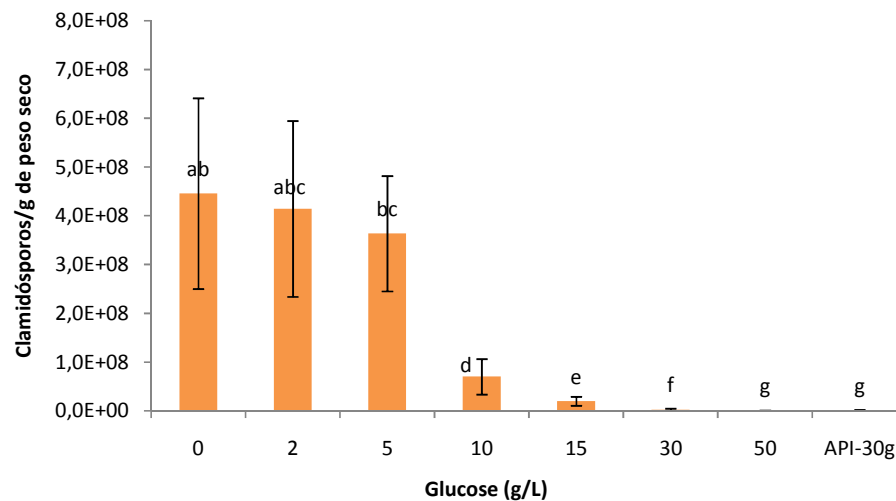


**Figura 3.1** – Efeito da glucose na produtividade volumétrica de clamidósporos e no peso seco de PcMR. Letras iguais sobre as barras significam que as produtividades volumétricas de clamidósporos não são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Intervalos sobre as barras = desvio padrão do conjunto de medidas efectuadas em cada concentração.

Até à concentração de 5g/L temos um aumento significativo ( $P<0,05$ )<sup>1</sup> da produtividade volumétrica de clamidósporos. A partir daí ocorre uma diminuição ( $P<0,05$ )<sup>1</sup>, chegando mesmo a valores semelhantes aos obtidos para o controlo negativo nas concentrações mais elevadas. Relativamente ao peso seco, verifica-se que existe um aumento ( $P<0,05$ )<sup>2</sup> com o incremento da concentração de glucose no meio, desde a concentração mais baixa até à concentração mais elevada.

A análise estatística permite identificar uma correlação negativa ( $P<0,01$ )<sup>3</sup> significativa entre a média de produtividade de clamidósporos e o peso seco.

No que se refere à produção de clamidósporos em função do peso seco (figura 3.2), verifica-se que esta não é superior ( $P<0,05$ )<sup>4</sup> na presença de glucose. Temos valores semelhantes ( $P<0,05$ )<sup>4</sup> entre o meio ALMA e o meio ALMA + 2g/L de glucose e uma diminuição ( $P<0,05$ )<sup>4</sup> nas concentrações mais elevadas que as coloca ao nível do controlo negativo ( $P<0,05$ )<sup>4</sup>.



**Figura 3.2** – Produção de clamidósporos em função do peso seco nos meios ALMA + glucose. Letras iguais sobre as barras significam que as produções de clamidósporos em função do peso seco não são significativamente diferentes ( $P<0,05$ ). Intervalos sobre as barras = desvio padrão do conjunto de medidas efectuadas em cada concentração.

Os resultados obtidos para a produtividade volumétrica de clamidósporos e para o peso seco, nos meios com sacarose (figura 3.3), apresentam um comportamento semelhante ao observado para a glucose. A única diferença é o facto de nas

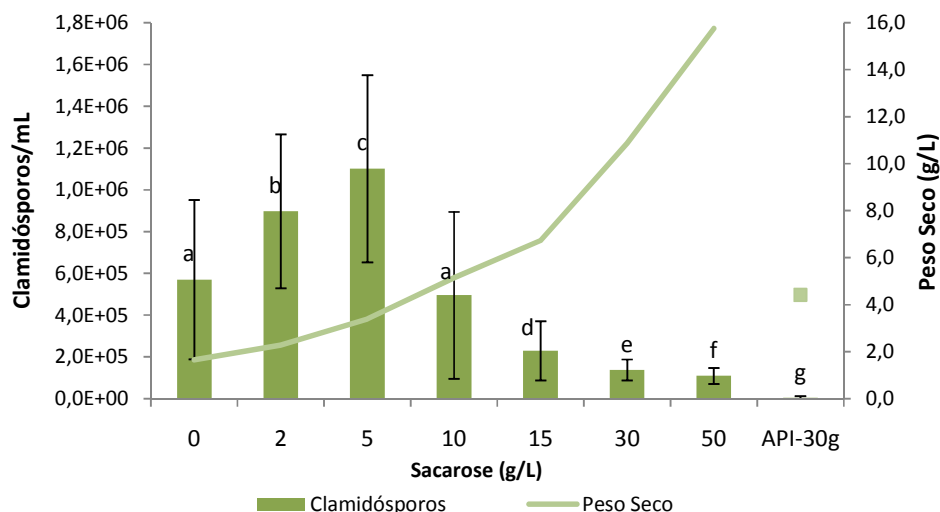
<sup>1</sup> Ver anexo I – Tabela 1

<sup>2</sup> Ver anexo I – Tabela 2

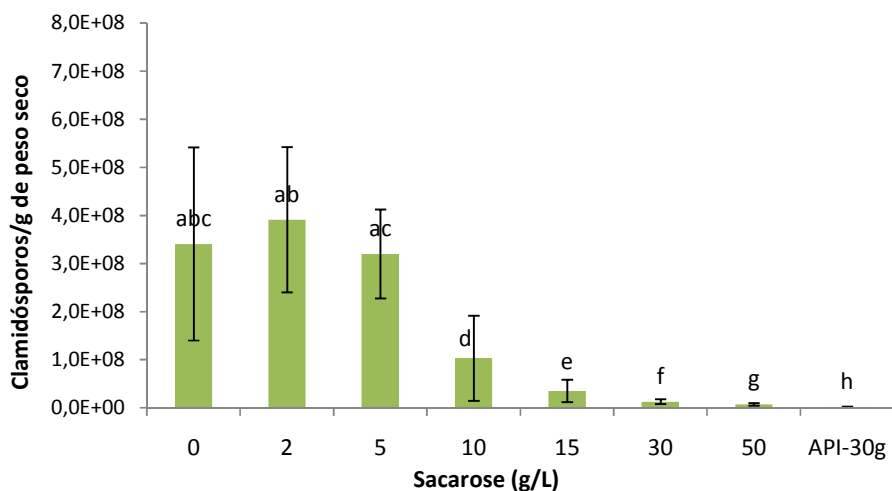
<sup>3</sup> Ver anexo I – Tabela 4

<sup>4</sup> Ver anexo I – Tabela 3

concentrações mais elevadas de sacarose, a produtividade volumétrica de clamidósporos ser superior ao controlo negativo ( $P<0,05$ )<sup>5</sup>. Neste teste observa-se que existe uma correlação negativa significativa ( $P<0,01$ )<sup>6</sup> entre a produtividade volumétrica de clamidósporos e o peso seco do fungo.



**Figura 3.3** – Efeito da sacarose na produtividade volumétrica de clamidósporos e no peso seco de PcMR. Letras iguais sobre as barras significam que as produtividades volumétricas de clamidósporos não são significativamente diferentes ( $P<0,05$ ). Intervalos sobre as barras = desvio padrão do conjunto de medidas efectuadas em cada concentração.



**Figura 3.4** – Produção de clamidósporos em função do peso seco dos meios ALMA + sacarose. Letras iguais sobre as barras significam que as produções de clamidósporos em função do peso seco não são significativamente diferentes ( $P<0,05$ ). Intervalos sobre as barras = desvio padrão do conjunto de medidas efectuadas em cada concentração.

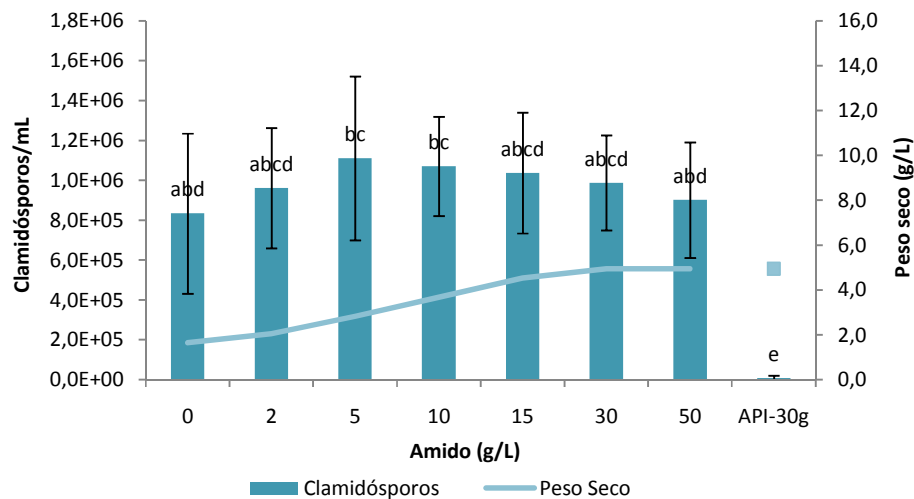
<sup>5</sup> Ver anexo I – Tabela 1

<sup>6</sup> Ver anexo I – Tabela 4

Na figura 3.4 observam-se os resultados de produção de clamidósporos em função do peso seco semelhantes aos obtidos nos meios de cultura com glucose.

A adição de amido ao meio ALMA (figura 3.5) não afecta a produtividade volumétrica de clamidósporos ( $P < 0,05$ )<sup>7</sup>. Ao contrário dos outros dois hidratos de carbono, todas as concentrações de amido estudadas, favorecem a produção de clamidósporos comparativamente ao meio ALMA ( $P < 0,05$ )<sup>8</sup>.

O peso seco aumenta ( $P < 0,05$ )<sup>9</sup> com o incremento da concentração de amido, verificando-se uma correlação negativa ( $P < 0,01$ )<sup>10</sup> entre a produtividade volumétrica de clamidósporos e o peso seco do fungo. Nas concentrações mais elevadas deste hidrato de carbono, o fungo apresenta valores de peso seco muito inferiores aos observados com a glucose e sacarose ( $P < 0,05$ )<sup>11</sup>.



**Figura 3.5** – Efeito do amido na produtividade volumétrica de clamidósporos e no peso seco de PcMR. Letras iguais sobre as barras significam que as produtividades volumétricas de clamidósporos não são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Intervalos sobre as barras = desvio padrão do conjunto de medidas efectuadas em cada concentração.

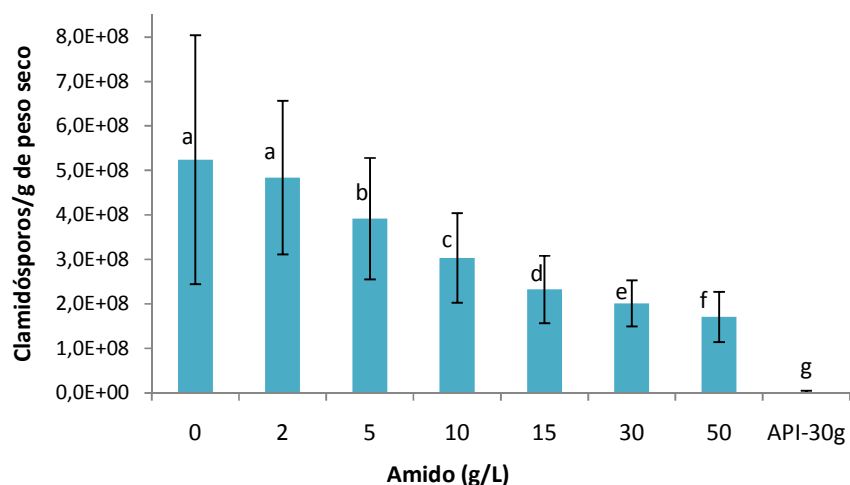
<sup>7</sup> Ver anexo – Tabela 1

<sup>8</sup> Ver anexo – Tabela 1

<sup>9</sup> Ver anexo – Tabela 2

<sup>10</sup> Ver anexo – Tabela 4

<sup>11</sup> Ver anexo – Tabela 6



**Figura 3.6** – Produção de clamidósporos em função do peso seco dos meios ALMA + amido. Letras iguais sobre as barras significam que as produções de clamidósporos em função do peso seco não são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Intervalos sobre as barras = desvio padrão do conjunto de medidas efectuadas em cada concentração.

Nos meios com concentrações mais elevadas de glucose e sacarose observou-se uma diminuição acentuada na produção de clamidósporos em função do peso seco, colocando-as ao nível do controlo negativo ( $P < 0,05$ )<sup>12</sup>. No caso dos meios com amido isso não se verifica (figura 3.6), uma vez que mesmo nestas concentrações as produções são elevadas.

Os resultados dos ensaios apresentam um elevado desvio padrão, apesar disso o meio ALMA (controlo positivo) atinge valores esperados de produtividade volumétrica de clamidósporos, na ordem dos  $10^5$  a  $10^6$ . Sendo que a relação das produtividades entre os diferentes meios e o controlo se mantêm constante, apesar desta variação na produção. Esta variação deve-se a três razões principais, nomeadamente a diferenças entre leituras, entre frascos e entre ensaios. As diferenças entre leituras podem dever-se à heterogeneidade do meio e não representam mais que 10 a 15%. A variação entre frascos pode atingir os 50% em alguns casos e a causa mais provável é a variabilidade biológica. As variações de produtividade observadas entre ensaios ocorreram sobretudo quando estes são realizados em momentos diferentes. Nesta situação, os factores que podem influenciar os resultados são alguma variabilidade biológica do fungo, variações na preparação do meio de cultura, no processo de esterilização e factores ambientais, nomeadamente a humidade relativa do ar. Por vezes, este tipo de variabilidade pode afectar de forma semelhante todo o teste como é o caso dos hidratos de carbono em

<sup>12</sup> Ver anexo – Tabela 3

que os ensaios com a glucose, a sacarose e o amido foram testados na mesma altura.

Os meios sólidos tradicionalmente utilizados na produção de clamidósporos são bastante ricos em amido e  $\beta$  – glucanos provenientes das sementes de alguns cereais que os constituem, tais como o trigo, o milho, cevada ou o arroz (Bird & Rogers, 1965; Abrantes *et al.*, 2002). Para além disso, na natureza, o fungo pode facilmente encontrar mucopolissacáridos na composição da matriz gelatinosa da massa de ovos do NGR (*Melodogyne* spp.) (Bird & Rogers, 1965). Assim, seria espectável que a adição de hidratos de carbono pudesse incentivar a produção de clamidósporos, contudo, isso nem sempre foi observado. Os resultados parecem mostrar que a adição de baixas concentrações de glucose e sacarose aumentam a produtividade volumétrica de clamidósporos de PcMR quando adicionados ao meio ALMA. No entanto, a produção de clamidósporos em função do peso seco diminui com a adição dos diferentes hidratos de carbono testados. Contudo, não é evidente que a adição destes hidratos de carbono leve ao aumento da produtividade volumétrica de clamidósporos, pois observa-se um elevado desvio padrão. Para além disso, nos controlos sem albumina e lecitina, o fungo não produz clamidósporos na presença de glucose, sacarose nem de amido. Cliquet & Jackson (2005) também verificaram que o fungo *Paecilomyces fumosoroseus* não apresentava necessariamente maiores produções de blastósporos em meios com elevadas concentrações de glucose. Contrariamente, o fungo *Beauveria bassiana* produz o máximo de conídios na presença de glucose, embora na presença de outras fontes de carbono produza igualmente conídios e blastósporos (Thomas *et al.*, 1987).

Por sua vez, é bem claro o aumento da produção de peso seco com o incremento da concentração dos três hidratos de carbono testados. A glucose é um monossacárido, sendo a fonte de carbono mais usada pelos fungos, apesar de muitas vezes não ser a fonte mais favorável ao seu desenvolvimento (Lilly & Barnett, 1951). No presente estudo verifica-se que o fungo consegue utilizar a glucose, uma vez que existe uma relação directa entre a adição deste hidrato de carbono ao meio e o peso seco. O fungo apresenta comportamento semelhante nos meios de cultura com sacarose. Esta situação sugere que, à semelhança de outros fungos (Carlile *et al.*, 2001), este fungo sintetiza enzimas extracelulares que permitem rapidamente hidrolizar este dissacárido em monossacáridos (glucose e frutose) e assim permitir a

sua assimilação. Por outro lado, o reduzido peso seco de PcMR observado nos meios com amido, comparado com meios com sacarose ou glucose, sugere que possivelmente o amido não é um nutriente preferencial. Contudo, o fungo aparenta ter capacidade de o degradar, uma vez que o fungo se desenvolve no meio de cultura em que a única fonte de carbono é o amido, API – 30g. O consumo preferencial de glucose ou sacarose, comparativamente ao amido, já foi observado em *Pochonia chlamydosporia* por outros autores (Mo *et al.*, 2005).

Uma das hipóteses para explicar as alterações provocadas no desenvolvimento do fungo pela adição de hidratos de carbono ao meio ALMA é a razão C:N. O aumento da concentração de hidratos de carbono no meio de cultura leva a um aumento da razão C:N, o que segundo alguns autores (Jackson & Schisler, 1992; Vega *et al.*, 2003; Cliquet & Jackson, 2005; Mo *et al.*, 2005) pode levar a uma diminuição da esporulação de alguns fungos. Esta situação ajuda a explicar a produção de clamidósporos de PcMR neste estudo. Um outro aspecto a ter em consideração é que o sistema de cultura líquida estacionária permite a formação de um micélio superficial que vai dificultar o desenvolvimento do fungo. Isso acontece, principalmente, porque essa camada de micélio vai impossibilitar as trocas gasosas entre a zona de interface fungo/líquido e a atmosfera que o envolve (Neidleman, 1989). Assim, o aumento da concentração de hidratos de carbono no meio de cultura leva a um maior desenvolvimento do micélio, limitando as trocas gasosas e reduzindo o teor de oxigénio. Esta situação pode ser uma razão para a estirpe PcMR manter níveis baixos de produção de clamidósporos em meios de cultura com concentrações mais elevadas de hidratos de carbono. Contudo, o teor de oxigénio parece não ser o único factor limitante na produção deste tipo de esporos pelo fungo. Em meios com elevada concentração de glucose e sacarose, embora os valores de peso seco atingidos sejam semelhantes, a produtividade volumétrica de clamidósporos é muito superior nos meios com o dissacárido.

De acordo com os resultados obtidos para o peso seco nos meios com glucose, sacarose e amido, o fungo consome preferencialmente os hidratos de carbono mais simples. Quando é adicionado amido ao meio de cultura, o peso seco do fungo é reduzido e a produção de clamidósporos é mais elevada comparativamente aos outros hidratos de carbono. Possivelmente, nesta situação, o fungo acaba por utilizar a albumina como fonte de carbono e uma vez que as proteínas têm um papel fundamental na produção de clamidósporos pela estirpe PcMR (Franco, 2005b),

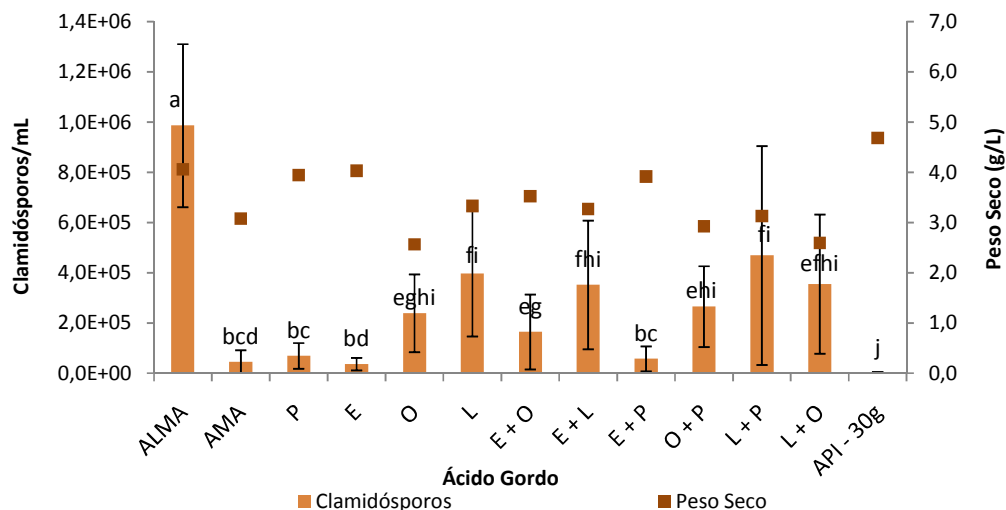


ocorre um aumento da produção deste tipo de esporos. O facto de o amido não ser um nutriente preferencial, corrobora a ideia de que o fungo prefere massas de ovos, ricas em lípidos e proteínas, em detrimento de uma alimentação saprófita, abundante em polissacáridos complexos (Abrantes *et al.*, 2002).

Como já foi referido, nos testes dos hidratos de carbono, observa-se algumas diferenças entre a produtividade volumétrica de clamidósporos e a produção de clamidósporos em função do peso seco. Esta situação deve-se ao facto do incremento da concentração destes hidratos de carbono no meio conduzir ao aumento do peso seco do fungo e ao facto da produtividade volumétrica de clamidósporos não aumentar na mesma proporção. Consequentemente, a adição de hidratos de carbono nos meios de cultura leva a um menor rendimento do peso seco em clamidósporos que por sua vez se reflecte na produção de clamidósporos em função do peso seco.

### 3.2 Efeito dos lípidos na produção de clamidósporos e peso seco de PcMR – Resultados e discussão

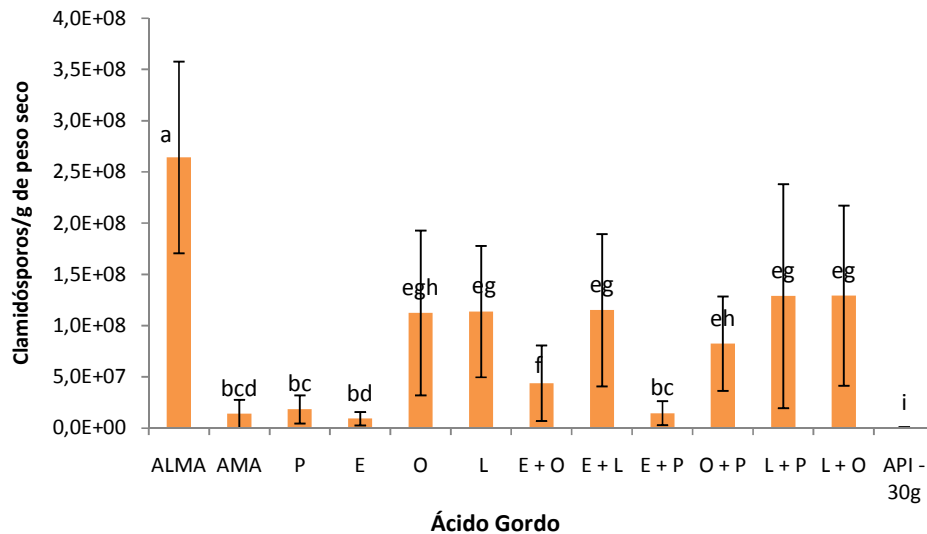
Neste ponto do trabalho pretende-se estudar o efeito da substituição da lecitina no meio ALMA, por ácidos gordos saturados e insaturados, triglicéridos heterogéneos e homogéneos, na produção de clamidósporos e peso seco de PcMR.



**Figura 3.7** – Efeito dos ácidos gordos na produtividade volumétrica de clamidósporos e no peso seco de PcMR. P – Ác. palmítico, E – Ác. esteárico, L – Ác. linoleico, O – Ác. oleico, API – Controlo (-). Letras iguais sobre as barras significam que as produtividades volumétricas de clamidósporos não são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Intervalos sobre as barras = desvio padrão do conjunto de medidas efectuadas em cada concentração.

Entre os meios testados (figura 3.7), os que contêm ácido linoleico são os que apresentam produtividades volumétricas de clamidósporos mais elevadas ( $P < 0,05$ )<sup>13</sup>. Por outro lado, o ácido palmítico e esteárico, em combinação ou isoladamente, são os meios com produções mais reduzidas ( $P < 0,05$ )<sup>13</sup> ao nível do meio AMA ( $P < 0,05$ )<sup>13</sup> mas significativamente superiores ao meio API-30g ( $P < 0,05$ )<sup>13</sup>.

O peso seco de PcMR, na maioria dos meios testados (figura 3.7), não apresenta diferenças significativas relativamente ao meio ALMA. Os meios com ácidos gordos insaturados, isoladamente ou combinações entre si, originam um peso seco inferior aos restantes ácidos gordos ( $P < 0,05$ )<sup>14</sup>.



**Figura 3.8** – Efeito dos Ác. gordos na produção de clamidósporos em função do peso seco de PcMR. P – Ác. palmítico, E – Ác. esteárico, L – Ác. linoleico, O – Ác. oleico, API – Controlo (-). Letras iguais sobre as barras significam que as produções de clamidósporos em função do peso seco não são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Intervalos sobre as barras = desvio padrão do conjunto de medidas efectuadas em cada concentração.

A produção de clamidósporos em função do peso seco (figura 3.8) nos meios com ácidos gordos insaturados, misturas de ácidos gordos insaturados ou de ácido gordos saturados com insaturados é significativamente superior ( $P < 0,05$ )<sup>15</sup> aos controlos negativos (AMA e API-30g). Contudo, é menor ( $P < 0,05$ )<sup>15</sup> que o meio ALMA. Os meios com ácidos gordos saturados apresentam produções menores ( $P < 0,05$ )<sup>15</sup> que os ácidos gordos insaturados, mas semelhantes ( $P < 0,05$ )<sup>15</sup> ao meio AMA.

<sup>13</sup> Ver anexo – Tabela 7

<sup>14</sup> Ver anexo – Tabela 8

<sup>15</sup> Ver anexo – Tabela 9

Nestes resultados tal como sucedeu nos ensaios dos hidratos de carbono observa-se um elevado desvio padrão que poderá ser explicado pelos mesmos factores mencionados no ponto 3.1 do trabalho (ver página 35).

Embora a importância dos lípidos na produção de clamidósporos já tenha sido estudada anteriormente e confirmada por estes resultados, é de salientar que nem todos os lípidos influenciam essa produtividade da mesma forma. Verifica-se que a produção de clamidósporos é superior quando se utiliza a lecitina como fonte lípídica em comparação com os ácidos gordos testados. A lecitina pode ser usualmente utilizada como sinónimo de fosfatidilcolina, sendo este o maior componente da fracção fosfolípídica. Contudo, a lecitina comercial é constituída por ácido fosfórico, colina, ácidos gordos, glicerol, glicolípidos, triglicéridos e fosfolípidos. A fracção fosfolípídica é constituída por 18% de fosfatidilcolina, 13% de fosfatidiletanolamina e 10% de fosfatidilinositol. A lecitina que pode ser isolada a partir da gema de ovo, de tecidos animais e de tecidos vegetais como por exemplo os feijões de soja (Wabel, C., 1998). No caso do meio de cultura ALMA é utilizada lecitina de soja.

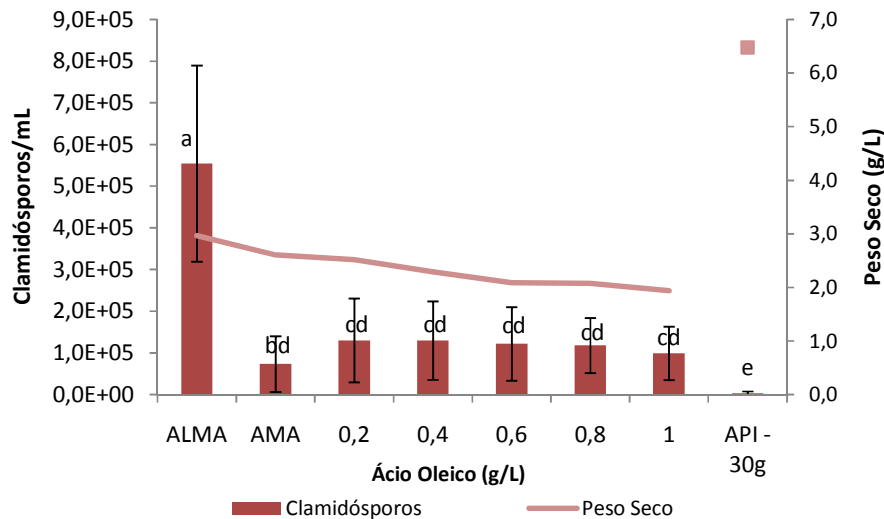
Embora nos meios de cultura com ácidos gordos, o fungo não atinja a produtividade volumétrica de clamidósporos dos meios com lecitina, verificou-se que os ácidos gordos insaturados permitem alcançar valores mais elevados que ácidos gordos saturados.

No que refere ao peso seco do fungo nos meios com ácidos gordos saturados, revelou-se superior ao observado para os ácidos gordos insaturados, sobretudo para o ácido oleico. Contudo, a comparação dos valores de peso seco obtidos para cada meio de cultura foi dificultada pela semelhança entre os valores. Essa semelhança parece ter sido causada não pela real semelhança entre a biomassa, mas sim por limitações no método utilizado na determinação do peso seco. Embora se tenha tentado minimizar esse problema, foi difícil contorná-lo devido ao facto dos substratos não utilizados pelo fungo, nomeadamente a albumina e a lecitina, sedimentarem juntamente com o micélio durante a centrifugação.

A importância dos ácidos gordos no metabolismo de fungos, nomeadamente no que se refere ao seu desenvolvimento normal, à sua sobrevivência e viabilidade celular já foi evidenciada anteriormente (Calvo *et al.*, 1999). Estudos com o género *Neurospora* mostraram que o fungo necessita de ácido oleico, linoleico e linolenico para o seu metabolismo, mas que não utilizam ácidos gordos saturados (Clifton *et al.*, 1951). À semelhança do género *Neurospora*, também a estirpe PcMR parece

não utilizar os ácidos gordos saturados, contudo não inibe o seu desenvolvimento nem a produção de clamidósporos.

Na figura seguinte observam-se os resultados do efeito de diferentes concentrações de ácido oleico em substituição da lecitina no meio ALMA +5g.



**Figura 3.9** – Efeito da concentração de ácido oleico na produtividade volumétrica de clamidósporos e no peso seco de PcMR. Letras iguais sobre as barras significam que as produtividades volumétricas de clamidósporos não são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Intervalos sobre as barras = desvio padrão do conjunto de medidas efectuadas em cada concentração.

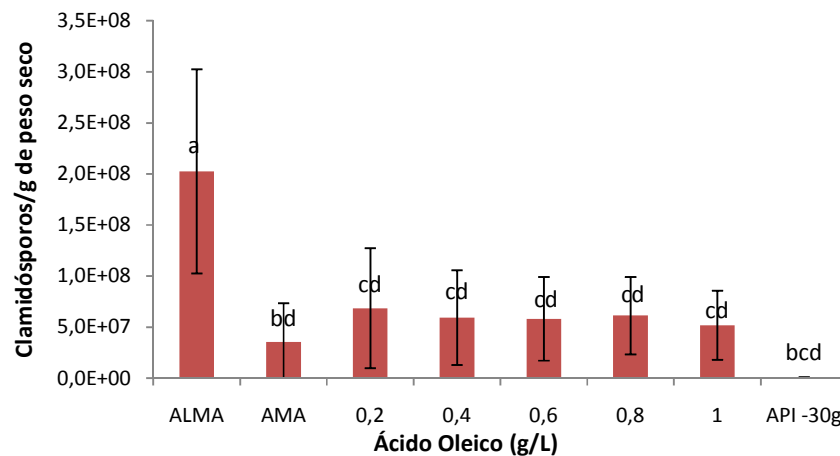
Verifica-se que a substituição da lecitina no meio ALMA por diferentes concentrações de ácido oleico (figura 3.9) afecta a produtividade de clamidósporos, sendo esta semelhante com concentrações de 0,2 a 1g/L ácido oleico. ( $P < 0,05$ )<sup>16</sup>. Nos meios testados são atingidas produtividades volumétricas de clamidósporos superiores ao meio AMA mas inferiores ( $P < 0,05$ )<sup>16</sup> ao meio ALMA. Os meios com diferentes concentrações de ácido oleico atingem valores de peso seco inferiores ao meio ALMA ( $P < 0,05$ )<sup>17</sup>.

A produção de clamidósporos em função do peso seco (figura 3.10) nos meios com diferentes concentrações de ácido oleico é superior ( $P < 0,05$ )<sup>18</sup> aos controlos negativos (AMA e API-30g), mas inferior ( $P < 0,05$ )<sup>18</sup> ao meio ALMA. Apesar de existir alguma variabilidade nos resultados, parece que os meios com concentrações entre 0,2 e 1g/l apresentam produções semelhantes.

<sup>16</sup> Ver anexo – Tabela 10

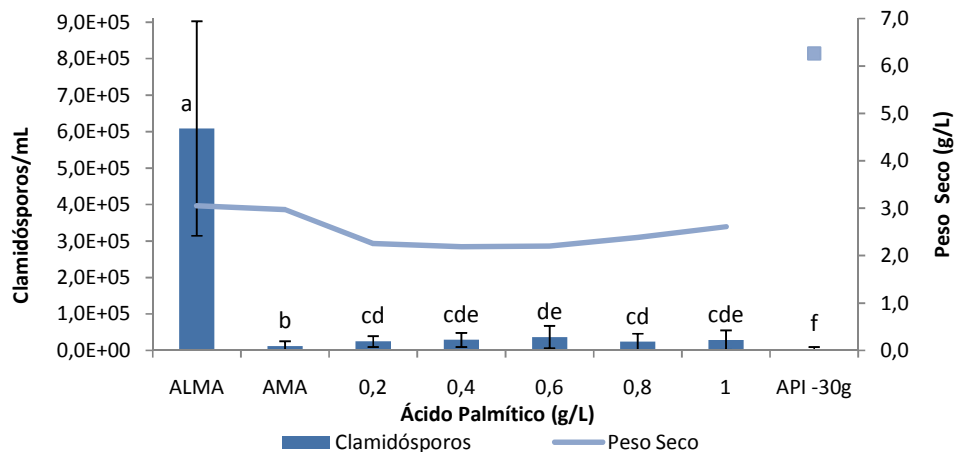
<sup>17</sup> Ver anexo – Tabela 11

<sup>18</sup> Ver anexo – Tabela 12



**Figura 3.10** – Efeito da concentração do ácido oleico na produção de clamidósporos em função do peso seco de PcMR. Letras iguais sobre as barras significam que as produções de clamidósporos em função do peso seco não são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Intervalos sobre as barras = desvio padrão do conjunto de medidas efectuadas em cada concentração.

Os resultados do efeito da concentração de ácido palmítico (figura 3.11) mostram que não existem diferenças ( $P < 0,05$ )<sup>19</sup> na produtividade volumétrica de clamidósporos, comparativamente com o meio AMA. Em todas a concentrações testadas, o peso seco do fungo é inferior ( $P < 0,05$ )<sup>20</sup> ao controlo negativo API-30g.

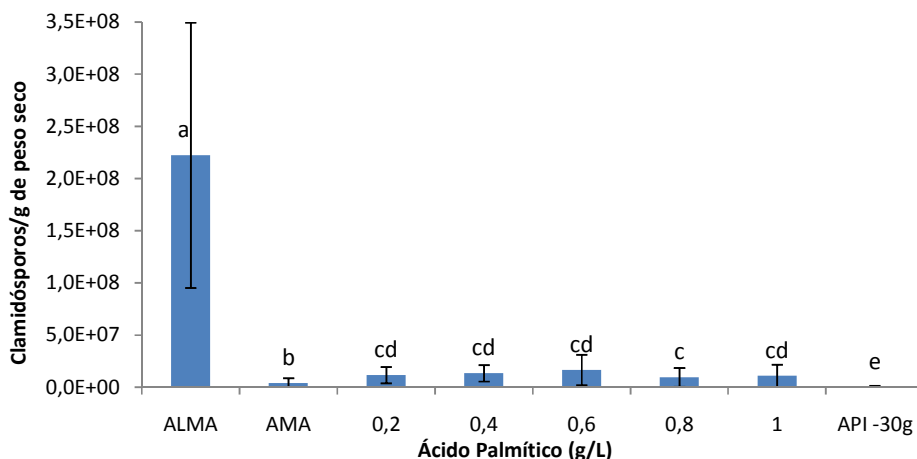


**Figura 3.11** – Efeito da concentração de ácido palmítico na produtividade volumétrica de clamidósporos e no peso seco de PcMR. Letras iguais sobre as barras significam que as produtividades volumétricas de clamidósporos não são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Intervalos sobre as barras = desvio padrão do conjunto de medidas efectuadas em cada concentração.

<sup>19</sup> Ver anexo – Tabela 13

<sup>20</sup> Ver anexo – Tabela 14

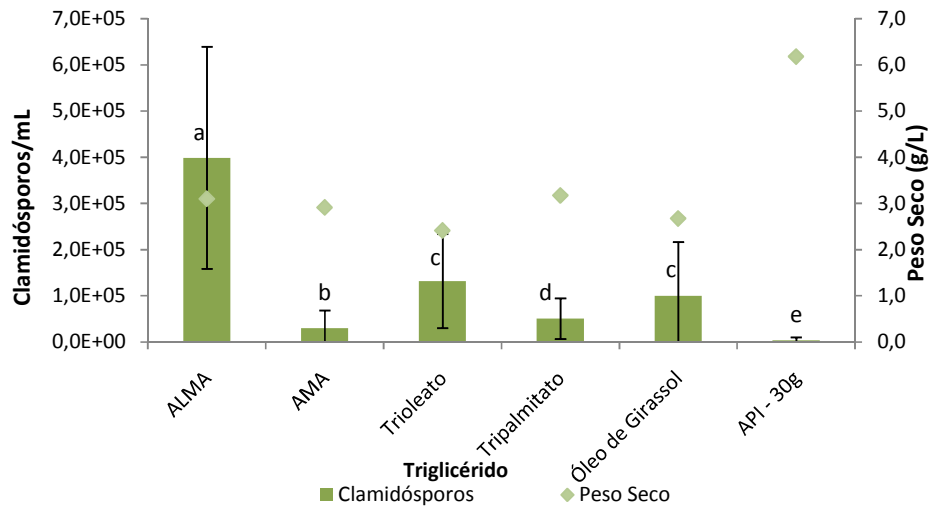
Os resultados da produção de clamidósporos em função do peso seco (figura 3.12), nos meios com concentrações diferentes de ácido palmítico, mostram valores inferiores ( $P < 0,05$ )<sup>21</sup> ao meio ALMA e superiores aos controlos negativos (AMA e API-30g).



**Figura 3.12** – Efeito da concentração do ácido palmítico na produção de clamidósporos em função do peso seco de PcMR. Letras iguais sobre as barras significam que as produções de clamidósporos em função do peso seco não são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Intervalos sobre as barras = desvio padrão do conjunto de medidas efectuadas em cada concentração.

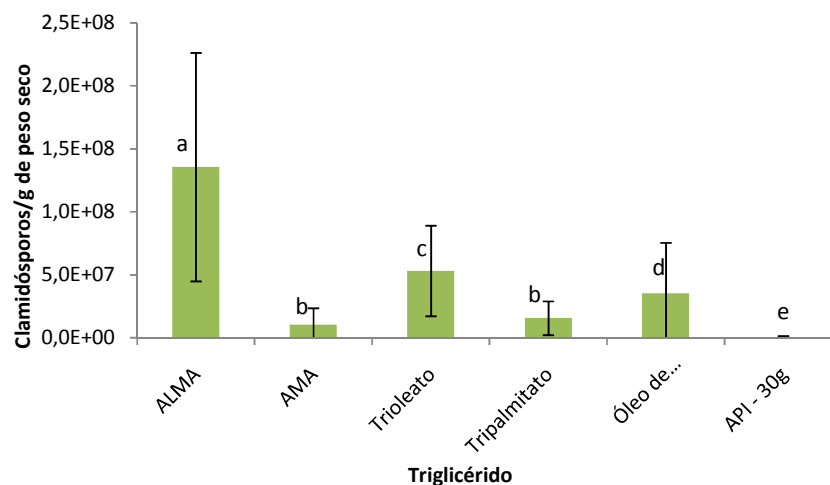
Em estudos anteriores já foi determinada a razão mais adequada entre a albumina de clara de ovo e a lecitina de soja no meio de cultura ALMA (Magriço, 2007). Nesse estudo verificou-se que para uma concentração fixa de albumina, só a partir de 1g/l de lecitina é alcançada a produtividade volumétrica de clamidósporos mais elevada. No presente estudo, verificou-se que embora não tenham sido alcançados os valores de produtividade obtidos com a lecitina, os valores máximos deste parâmetro foram alcançados com concentrações de ácido gordo insaturado abaixo da 1g/l. Com concentrações de 0.2g/l já era atingida a produção máxima alcançada com concentrações superiores. Essa situação foi observada tanto no caso do ácido oleico, como na combinação de ácidos gordos insaturados com saturados, em que eram utilizadas 0.5g/l de cada. A importância dos ácidos gordos insaturados na produção de clamidósporos por PcMR é corroborada por estudos efectuados no género *Aspergillus* em que se refere a necessidade de uma fonte adicional de ácidos gordos insaturados e seus derivados na produção de estruturas multicelulares, tais como, conidióforos, cleistotecas e esclerotos (Calvo *et al.*, 1999).

<sup>21</sup> Ver anexo – Tabela 15



**Figura 3.13** – Efeito dos triglicéridos na produtividade volumétrica de clamidósporos e no peso seco de PcMR. Letras iguais sobre as barras significam que as produtividades volumétricas de clamidósporos não são significativamente diferentes ( $P<0,05$ ). Intervalos sobre as barras = desvio padrão do conjunto de medidas efectuadas em cada concentração.

Os meios com trioleato, tripalmitato e óleo de girassol (figura 3.13) permitem produções de clamidósporos superiores ( $P<0,05$ )<sup>22</sup> aos controlos negativos (AMA e API-30g), mas inferiores ( $P<0,05$ )<sup>22</sup> ao meio ALMA. Os valores de peso seco do fungo para cada ensaio não são diferentes ( $P<0,05$ )<sup>23</sup> entre si.



**Figura 3.14** – Efeito dos triglicéridos na produção de clamidósporos em função do peso seco de PcMR. Letras iguais sobre as barras significam que as produções de clamidósporos em função do peso seco não são significativamente diferentes ( $P<0,05$ ). Intervalos sobre as barras = desvio padrão do conjunto de medidas efectuadas em cada concentração.

<sup>22</sup> Ver anexo – Tabela 16

<sup>23</sup> Ver anexo – Tabela 7

Os resultados da produção de clamidósporos em função do peso seco, (figura 3.14) nos meios com triglicéridos, são superiores ( $P < 0,05$ )<sup>24</sup> aos controlos negativos (AMA e API-30g), mas inferiores ( $P < 0,05$ ) ao meio ALMA. Entre os triglicéridos testados o trioleato é o que apresenta produtividades superiores ( $P < 0,05$ )<sup>24</sup> e o tripalmitato as inferiores ( $P < 0,05$ )<sup>24</sup>.

O trioleato é um triglicérido com três cadeias de ácido oleico e o óleo de girassol é uma mistura de triglicéridos ricos em ácido oleico e linoleico (Belitz & Grosch, 1999). Os resultados dos ensaios com estes triglicéridos sugerem que o fungo tem dificuldade em digeri-los. Uma vez que foi demonstrado que o fungo consegue utilizar os ácidos insaturados na sua forma livre, seria espetável que conseguisse produzir clamidósporos na presença de compostos constituídos maioritariamente por este tipo de ácidos gordos. Contudo, isso não sucede, possivelmente por o fungo ter dificuldade em degradar este tipo de lípidos.

A necessidade de lípidos no metabolismo do fungo parece ser evidente, principalmente no que diz respeito à produção de clamidósporos que possuem na sua constituição inclusões lipídicas. Apesar do efeito positivo dos ácidos gordos insaturados na produção de clamidósporos, parece não ser o único constituinte da lecitina com papel importante na formação deste tipo de esporos pela estirpe em causa. De entre os restantes constituintes da lecitina comercial, verificou-se que os triglicéridos não favorecem a produção de clamidósporos. A hipótese de que seja o ácido fosfórico fica colocada de parte uma vez que o meio de cultura contém fósforo na sua constituição. Resta ainda estudar um possível efeito da colina ou fosfatilcolina, o inositol ou fosfatidilinositol, a fosfatidiletanolamina ou etanolamina, ou algum componente presente nos outros fosfolípidos, ou nos glicolípidos.

No solo, os clamidósporos são formados durante o processo de parasitismo dos ovos (Abrantes *et al.*, 2002) que são naturalmente ricos em proteínas e lípidos. No presente estudo foi possível mais uma vez confirmar a importância destes nutrientes nos meios de cultura na formação de clamidósporos pela estirpe PcMR.

---

<sup>24</sup> Ver anexo – Tabela 18



### 3.3 Conclusões

Pretendeu-se neste ponto do trabalho estudar o efeito da adição de hidratos de carbono e substituição de lípidos no meio ALMA na produção de clamidósporos e peso seco de PcMR em cultura líquida estacionária.

O fungo consome preferencialmente monossacáridos e dissacáridos em detrimento de polissacáridos. Em meios com sacarose ou glucose o PcMR apresenta valores de peso seco superiores aos obtidos em meios com amido. Apesar de ser nos meios com este polissacárido que se observam maiores produções de clamidósporos. Esta situação parece indicar que o fungo não consome preferencialmente o amido e utiliza a albumina como fonte de carbono, essencial à produção deste tipo de esporos.

O incremento da concentração dos hidratos de carbono conduziu a um aumento proporcional do peso seco do fungo. Os valores mais elevados de produtividade volumétrica de clamidósporos e a produção de clamidósporos em função do peso seco são obtidos com concentrações baixas (até 5g/L) de glucose ou sacarose. Por outro lado nas concentrações mais elevadas (> 5 g/L) verificou-se uma diminuição das produtividades. O incremento da concentração de amido no meio de cultura não afecta a produtividade volumétrica de clamidósporos, contudo o fungo apresenta um comportamento semelhante aos restantes hidratos de carbono em termos da produção de clamidósporos em função do peso seco.

A substituição da lecitina por outros lípidos permitiu avaliar quais os mais importantes na produção de clamidósporos. A lecitina é o lípido que permite produções mais elevadas de clamidósporos. Os ácidos gordos insaturados originam produtividades elevadas de clamidósporos. Embora não tenham sido alcançados os valores de produtividade obtidos com a lecitina, os valores mais elevados foram alcançados com concentrações de ácido gordo insaturado abaixo de 1g/l. Por outro lado, os ácidos gordos saturados e os triglicéridos não permitiram obter diferenças significativas relativamente aos controlos negativos. Em relação ao peso seco do fungo, todos os lípidos estudados não apresentam diferenças relativamente ao controlo positivo.

#### 4. Curvas de crescimento de PcMR – Resultados e discussão

Para além dos estudos de maximização da produtividade volumétrica de clamidósporos, a avaliação do comportamento de PcMR ao longo do processo fermentativo é fundamental na compreensão da importância dos elementos nutritivos no seu desenvolvimento. O crescimento da estirpe PcMR foi acompanhado ao longo dos 30 dias de cultura. Foi avaliada a evolução da produção de clamidósporos e o peso seco. Para além disso, também foi avaliado o consumo dos principais nutrientes do meio de cultura, albumina, lecitina e glucose. Este ensaio foi efectuado no meio ALMA, ALMA + 5g de glucose (efectuado 2 vezes) e ALMA + 15g de glucose.

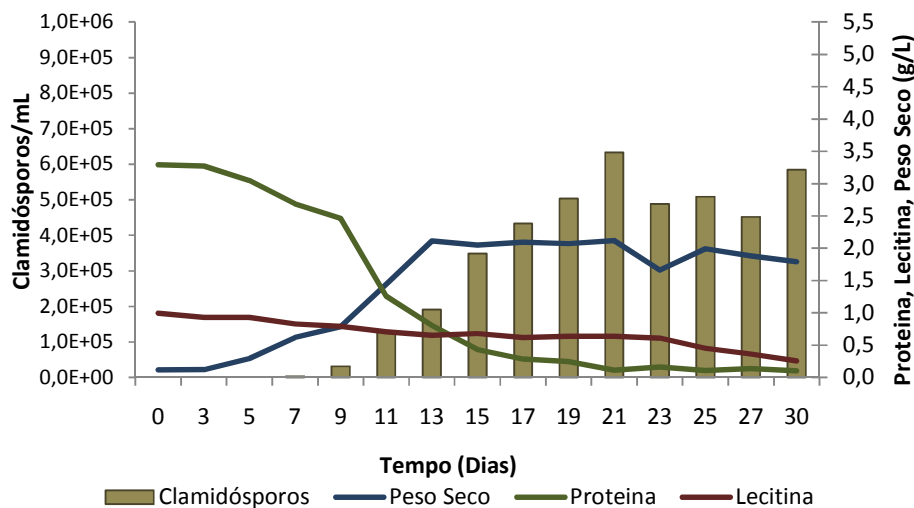


Figura 4.1 – Curva de crescimento de PcMR em meio ALMA.

No meio ALMA (figura 4.1) o fungo inicia o seu desenvolvimento por volta do 5º dia de fermentação, atingindo a fase estacionária ao 15º dia, data na qual o fungo apresentava 2,5g/L de peso seco. A produção de clamidósporos inicia-se ao 9º dia de fermentação, atingido o máximo de produtividade volumétrica ao 21º dia com  $6,33 \times 10^5$  clamidósporos e  $2,99 \times 10^8$  clamidósporos em função do peso seco. O fungo consome a quase totalidade da albumina do meio, sendo esse consumo maior entre o 5º e o 21º dia. É neste período de tempo em que se dá a maior produção de clamidósporos e de peso seco. Por outro lado o consumo de lecitina foi constante até ao 21º dia e a partir daí subiu. No final dos 30 dias o sobrenadante do meio de cultura ainda continha cerca de 0,10g/L de albumina e 0,25g/ de lecitina.

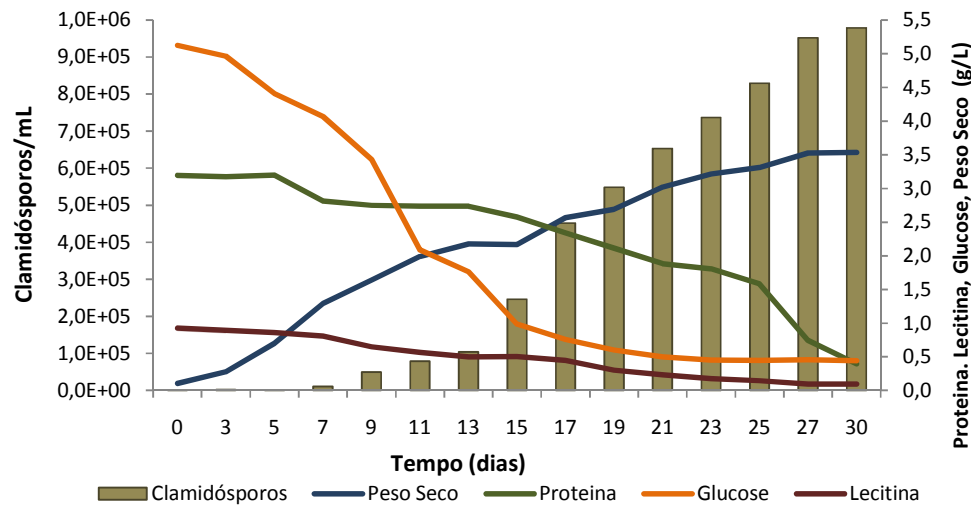


Figura 4.2 – Curva de crescimento de PcMR em meio ALMA+ 5g de glucose (1º Ensaio).

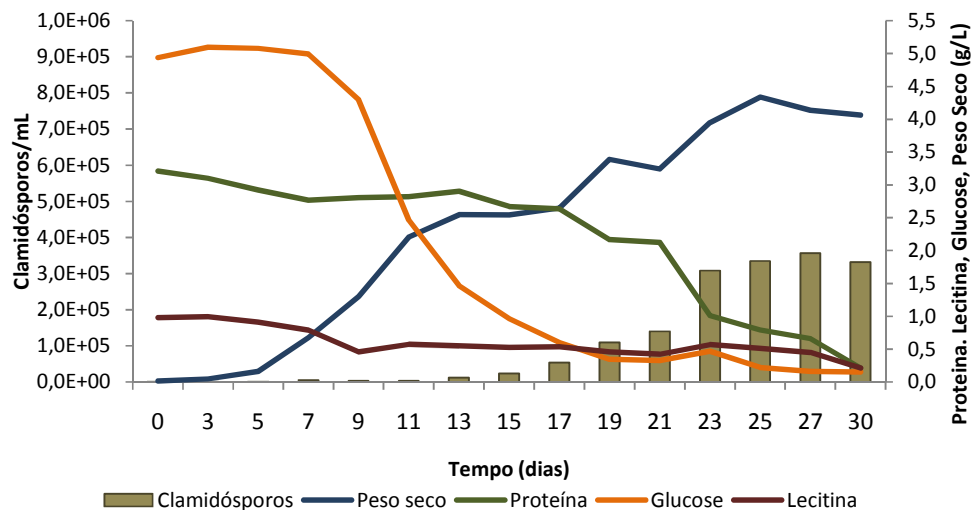
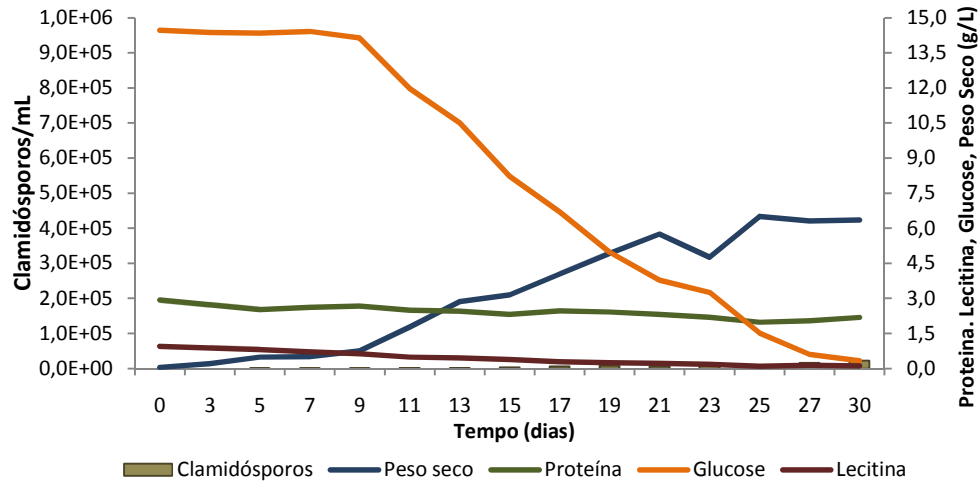


Figura 4.3 – Curva de crescimento de PcMR em meio ALMA + 5 g de glucose (2º Ensaio).

O fungo *Pochonia chlamydosporia* no meio ALMA + 5g de glucose (figura 4.2 e 4.3) inicia o sua fase exponencial de crescimento a partir do 3º dia de fermentação e atinge a fase estacionária por volta do 27º ou 25º dia (1º e 2º ensaio respectivamente). A produção de clamidósporos inicia-se por volta do 9º (1º ensaio) ou 13º dia (2º ensaio), e ocorre até ao final do processo fermentativo. O consumo de glucose inicia-se com o desenvolvimento do fungo, mantendo-se elevado até estabilizar por volta do 23º/25º dia (1º e 2º ensaio). No final dos 30 dias, pouco mais de 0,4g/L (1º ensaio) e 0,15g/L (2º ensaio) de glucose permanecia no meio de cultura. A albumina vai sendo consumida ao longo de todo o processo fermentativo, sendo que a partir do 25º (ensaio 1) ou 21º (ensaio 2) dia, a velocidade de consumo

começa a aumentar. Contudo, não é consumida na sua totalidade. No 1º ensaio, o consumo de lecitina é gradual ao longo dos 30 dias da cultura, enquanto no 2º ensaio este consumo acontece sobretudo no final do processo fermentativo.



**Figura 4.4** – Curva de crescimento de PcMR em meio ALMA + 15g de glucose.

Observa-se um desenvolvimento exponencial do fungo no meio ALMA + 15g de glucose (figura 4.4) entre o 9º dia e o 25º dia de fermentação, atingindo nessa altura cerca de 6,50 g/L de peso seco e entrando, a partir daí, em fase estacionária. Relativamente à produtividade volumétrica de clamidósporos observa-se que é muito reduzida, atingindo o máximo de  $2 \times 10^4$  no final dos 30 dias de cultura. O consumo de glucose acentua-se a partir do 9º dia até ao final do processo, registando-se nessa altura menos de 0,5g/L de glucose no meio. Neste meio, o consumo de albumina por parte do fungo é reduzida, restando mais de 2g/L de albumina no final da cultura. O consumo de lecitina é constante ao longo do tempo de cultura, restando cerca de 0,10g/L no final dos 30 dias.

As curvas de crescimento realizadas permitiram observar que na presença de glucose o fungo desenvolve-se mais rapidamente. Esta situação explica-se pelo facto da glucose ser facilmente assimilável pelo fungo, ao contrário da albumina e da lecitina que também poderão ser utilizadas como fontes de carbono. Um outro aspecto importante é que na presença de quantidades elevadas de glucose a produção de clamidósporos é reduzida. Isto ocorre em virtude do metabolismo do fungo ser dirigido ao crescimento, com elevadas concentrações deste substrato, em detrimento da produção de clamidósporos. Para além disso, a preferência pela

glucose em detrimento da albumina, leva a uma menor produção de clamidósporos, pois a esporulação destes esporos está associada ao consumo da albumina. A análise do consumo dos nutrientes permitiu confirmar o consumo reduzido de albumina na presença de elevadas concentrações de glucose. Assim, pode-se depreender que a existência deste monossacárido no meio de cultura afecta realmente o consumo de albumina. Para além disso, também foi evidente, no meio ALMA+ 5g, o aumento do consumo de albumina na altura em que a concentração de glucose já se apresentava bastante reduzida. Nesta situação, é de realçar a fraca sensibilidade do método do DNS para concentrações mais baixas em que se obtêm leituras provavelmente superiores ao existente na realidade.

No meio ALMA é evidente que o pico máximo da produção de clamidósporos só é atingido após o estabelecimento da fase estacionária. Nos meios com glucose isso não se observa, uma vez que a fase estacionária só é atingida praticamente no final dos 30 dias, altura em que a concentração do monossacárido no meio de cultura é bastante reduzida. Assim, parece que nos meios em que o fungo cresceu mais, a produção de clamidósporos foi prolongada no tempo, mesmo quando reduzida. A produção de clamidósporos parece ocorrer apenas após o fungo atingir um certo nível de desenvolvimento e quando as concentrações de glucose no meio de cultura são reduzidas. Nessa fase o fungo inicia o consumo de albumina e a produção de clamidósporos é maior.

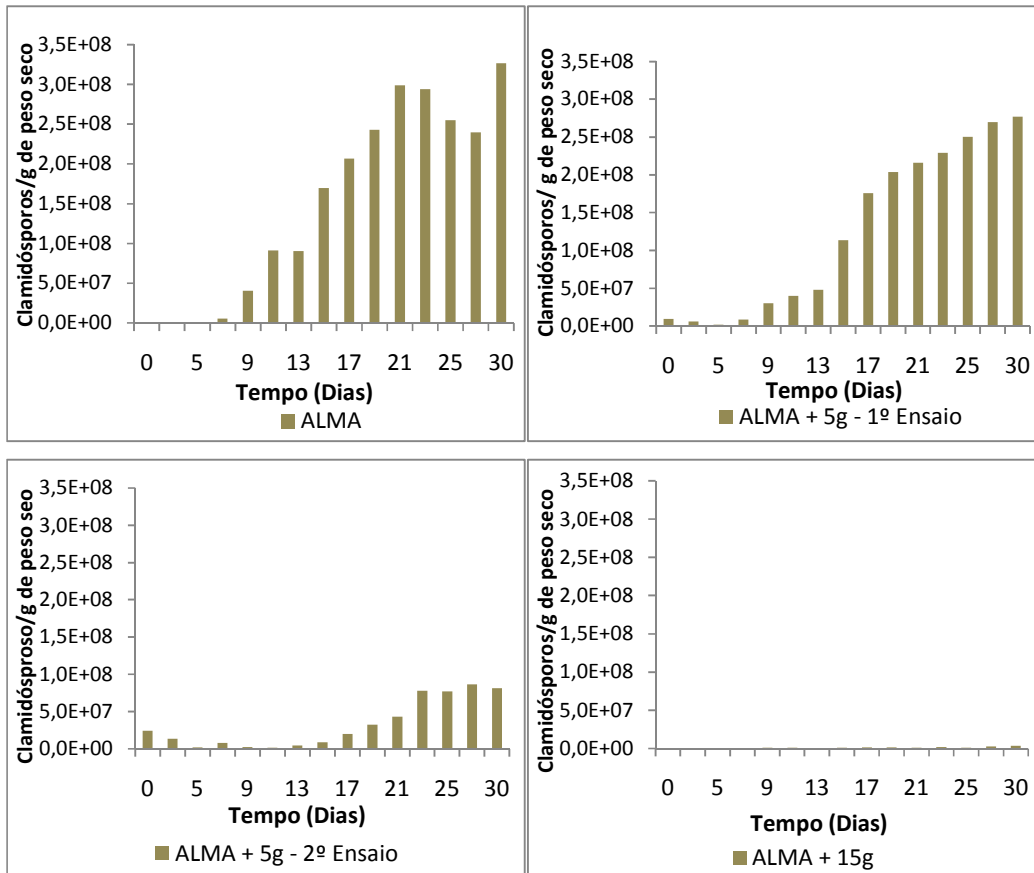
Nos ensaios da curva de crescimento, tal como sucedeu nos restantes ensaios, verificou-se alguma variação nos resultados, nomeadamente nos 2 ensaios no meio ALMA +5g de glucose. Embora os valores de produtividade volumétrica de clamidósporos tenham sido mais baixos num dos ensaios, ainda se encontram dentro do intervalo de valores espectável para aquele meio de cultura, ou seja,  $10^5$  e  $10^6$  clamidósporos/ml. Esta variação deve-se às mesmas razões apontadas anteriormente (ver página 35), e que são responsáveis por alguma variabilidade nos resultados. Contudo, apesar das razões apontadas não se sabe concretamente a que se deve tão grande variação entre ensaios.

O consumo de lecitina ocorre independentemente da restante composição do meio, sendo maior nos meios em que o fungo se desenvolve mais. Isso acontece possivelmente porque a lecitina é necessária no desenvolvimento de outras estruturas do fungo para além dos clamidósporos, nomeadamente na formação de conídios e hifas. Daí que a lecitina seja consumida em maior quantidade em meios

em que o fungo cresce mais, nomeadamente no meio ALMA +15g. No meio ALMA, o seu consumo ocorre mesmo após se atingir o máximo de crescimento e de produção de clamidósporos. Este facto pode dever-se ao desenvolvimento dos clamidósporos que continuam a acumular substâncias de reserva. As substâncias de reserva, nomeadamente inclusões lipídicas, são importantes no parasitismo do nemátode e como estruturas de resistência. As inclusões lipídicas funcionam como reservas de energia que possibilitam os clamidósporos germinar, colonizar o solo e a rizosfera das plantas durante o parasitismo. Assim, o consumo de lecitina parece ser fundamental para o desenvolvimento dos clamidósporos, para além de poder estar presente na constituição de outras estruturas do fungo.

No meio ALMA +15g, mesmo após se esgotar a glucose, a albumina não é consumida. Esta situação pode dever-se ao deterioramento das condições do meio de cultura, ao tempo de fermentação insuficiente, ou à formação de metabolitos secundários.

Na figura seguinte observa-se a evolução da produtividade de clamidósporos em função do peso seco nos meios estudados.



**Figura 4.5** – Produção de clamidósporos em função do peso seco nos meios ALMA, ALMA + 5g (1º Ensaio), ALMA + 5g (2º Ensaio) e ALMA + 15g.

Verificou-se que a produção de clamidósporos em função do peso seco (figura 4.5) apresenta um comportamento semelhante ao observado na produtividade volumétrica. A relação entre o peso seco e a produção de clamidósporos ao longo do tempo do processo fermentativo, permaneceu constante. Apesar da variabilidade do rendimento em clamidósporos existente entre ensaios (ver página 35), mais uma vez se verifica que este parâmetro é superior no meio ALMA. É de salientar que é neste meio que a produção de clamidósporos é máxima em função da peso seco produzido.

**Tabela 4.1** – Rendimentos da produtividade volumétrica de clamidósporos e peso seco nos meios estudados.

Coeficientes	Meios			
	ALMA	ALMA + 5g 1º Ensaio	ALMA + 5g 2º Ensaio	ALMA + 15g
<b>Yclam/Peso Seco (nº/g)</b>	3,50E+08	2,85E+08	8,18E+07	3,44E+06
<b>Yclam/Albumina (nº/g)</b>	1,84E+08	3,49E+08	1,11E+08	2,91E+07
<b>Yclam/Lecitina (nº/g)</b>	7,95E+08	1,18E+09	4,31E+08	2,60E+07
<b>Yclam/Glucose (nº/g)</b>	-	2,09E+08	6,92E+07	1,53E+06
<b>Yclam/Substrato Total (nº/g)</b>	1,49E+08	1,18E+08	3,87E+07	1,38E+06
<b>YPeso Seco/Albumina (g/g)</b>	0,525	1,225	1,351	8,453
<b>YPeso Seco/Lecitina (g/g)</b>	2,272	4,120	5,265	7,554
<b>YPeso Seco/Glucose (g/g)</b>	-	0,732	0,846	0,446
<b>YPeso Seco/substrato Total (g/g)</b>	0,427	0,412	0,473	0,401

Na tabela 4.1 observa-se que o rendimento máximo de clamidósporos produzidos por unidade de substrato é conseguida no meio ALMA e meio ALMA + 5g (1º ensaio), por outro lado o meio ALMA +15g atinge um rendimento 100 vezes inferior. O meio ALMA +5g (1º ensaio) apresenta o maior rendimento em produção de clamidósporos em função da albumina, da lecitina e glucose consumida. O rendimento do substrato em peso seco de PcMR é ligeiramente superior a 40% no meio ALMA, ALMA + 5g (1º ensaio) e ALMA + 15g. No que diz respeito ao rendimento da conversão dos substratos em peso seco é pouco superior a 40% nos 3 meios estudados, excepto para o 2º ensaio do meio ALMA+5g no qual é um pouco superior. Em suma, o fungo mantém o mesmo nível de conversão do substrato em biomassa independentemente da quantidade de substrato no meio e é evidente uma relação directa entre a produção de biomassa e a quantidade de substrato no meio. É ainda de salientar a importância do crescimento vegetativo para a produção de clamidósporos. Daí que na presença de glucose, o fungo não necessite de consumir tanta quantidade de albumina para atingir a mesma produtividade volumétrica de clamidósporos que em meios sem o monossacárido.



## 5. Conclusão

A realização deste trabalho permitiu determinar a influência de alguns nutrientes chave do meio nutritivo para a produção de clamidósporos e peso seco do fungo *Pochonia chlamydosporia*, estirpe PcMR. Os resultados obtidos contribuem de forma positiva para a compreensão da importância dos elementos nutritivos do meio de cultura para a produção de clamidósporos.

A adição de hidratos de carbono simples ao meio ALMA, possibilita um maior desenvolvimento do fungo, sendo a formação de biomassa proporcional à concentração destes nutrientes no meio. O fungo consome preferencialmente hidratos de carbono simples em detrimento de polissacáridos. Para além disso, o fungo consome preferencialmente proteína, em detrimento do amido. Em meios com concentrações mais elevadas (> 5g/L) de glucose ou sacarose fungo apresenta produções de clamidósporos reduzidas. A adição de amido ao meio não afecta a produção de clamidósporos, contudo leva a uma maior formação de biomassa, o que origina que o incremento da concentração deste polissacárido diminua a produção de clamidósporos em função do peso seco.

Em cultura estacionária não será aconselhável colocar elevadas quantidades de hidratos de carbono para produção de clamidósporos, visto que embora o fungo cresça bem nestes meios, as produtividades de clamidósporos são reduzidas.

A lectina é a melhor fonte lipídica para a produção de clamidósporos de PcMR. Em meios nos quais a lecitina é substituída por ácido gordos insaturados, ácidos gordos saturados ou triglicéridos as produtividades de clamidósporos são mais reduzidas. Contudo, relativamente ao peso seco os valores são semelhantes para todos os lípidos estudados.

As curvas de crescimento realizadas permitiram observar que na presença de glucose o fungo se desenvolve mais rapidamente. A adição de glucose ao meio de cultura afecta o consumo de albumina pelo fungo, sendo que na presença de quantidades elevadas de glucose a produção de clamidósporos é reduzida. Parece existir um consumo preferencial da glucose em detrimento da albumina, e consequentemente, ocorrem produtividades de clamidósporos inferiores uma vez que a produção de clamidósporos está associada ao consumo de albumina.

A produção de clamidósporos parece ocorrer apenas após o fungo atingir um certo nível de desenvolvimento e quando as concentrações de glucose no meio de cultura são reduzidas, e está dependente do consumo de albumina.

O consumo de lecitina ocorre independentemente da restante composição do meio, sendo maior nos meios em que o fungo se desenvolve mais. Sendo assim, um nutriente indispensável para a produção de clamidósporos do PcMR, e para o qual o fungo tem uma forte apetência mesmo quando não produz este tipo de esporos.

Os resultados obtidos nas várias curvas de crescimento salientaram a importância de um limiar mínimo de crescimento vegetativo inicial para a produção de clamidósporos.

Foi demonstrada a obtenção de elevadas produtividades volumétricas e do peso seco em meios líquidos de PcMR, que permitem obter mais de  $10^6$  clamidósporos/ml o que permite encarar com confiança a produção industrial de clamidósporos. Foi demonstrado que a adição de hidratos de carbono não é necessária e que é até desaconselhada porque origina uma diminuição da produtividade de clamidósporos em função do peso seco.

## 6. Considerações finais e perspectivas futuras

O fungo PcMR tem sido apontado por muitos investigadores como sendo uma agente muito promissor no controlo biológico do nemátode-das-galhas-radiculares (Kerry, 2001). Muitos estudos têm sido efectuados com o intuito de desenvolver as potencialidades desta espécie (Irving & Kerry, 1986), contudo mesmo com os desenvolvimentos conseguidos, ainda não foi possível fazer deste fungo nematófago um agente de controlo biológico suficientemente eficaz de forma a ser comercializado em larga escala.

São necessários mais desenvolvimentos no sentido de tornar este fungo, um agente de controlo biológico com viabilidade económica. Entre as dificuldades existentes destaca-se a necessidade de compreender o estabelecimento do fungo no solo e as reduzidas produtividades de clamidósporos nos meios de cultura utilizados (Kerry *et al.*, 2004).

Este trabalho inseriu-se no esforço de utilizar o fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*, na constituição de um biopesticida com interesse agronómico. Assim, pretendeu-se estudar o efeito da nutrição na produção de clamidósporos e peso seco do PcMR. Os resultados obtidos vêm reforçar a ideia da importância do meio de cultura para o desenvolvimento do fungo e formação de clamidósporos. Compreender como a composição do meio afecta a formação de propágulos por parte do fungo é fundamental para atingir esse desiderato.

Neste estudo foi possível confirmar que a albumina e a lecitina são indispensáveis para a formação de clamidósporos e como o seu consumo é efectuado ao longo do processo fermentativo. É necessário compreender de que forma o fungo determina qual o nutriente que deve utilizar preferencialmente como fonte de carbono e de que forma lida com a presença da albumina na ausência duma forma inorgânica de azoto. É necessário compreender o papel da lecitina e nomeadamente o papel dos produtos da decomposição desta, como os ácidos gordos insaturados, o fosfato, o glicerol, a colina ou a fosfatilcolina, o inositol ou o fosfatidilinositol, a fosfatidiletanolamina ou etanolamina, ou algum componente presente nos outros fosfolípidos, ou nos glicolípidos.

Para um futuro processo de optimização é necessário utilizar fermentadores que possibilitem uma fermentação em cultura submersa, considerado o sistema mais económico para produzir microorganismos como agentes de controlo biológico (Jackson, 1997). A utilização destes fermentadores permitirá controlar diversos

parâmetros (homogeneidade do meio, teor de oxigénio ou pH) que afectam o processo fermentativo, obter resultados mais consistentes e consequentemente melhorar a compreensão do desenvolvimento do fungo.

Numa futura utilização do fungo *Pochonia chlamydosporia* do ponto vista industrial a produção de muita biomassa será prejudicial nos processos pós-fermentativos, nomeadamente na extracção dos clamidósporos. Assim, é essencial maximizar o rendimento da biomassa em clamidósporos para se conseguir um sistema produtivo mais eficiente.

## 7. Referências bibliográficas

- Abrantes, I. M. De O., Bourne, J. M., Brito, I., Ciancio, A.; Hirsch, P. R., Kerry, B. R., Lopez-Llorca, L. V., Mota, M.M., Santos, M. S. N. De A., Tzortzakakis, E. A. & Verdejo-Lucas, S.** (2002) A Manual for Research on *Verticillium chlamydosporium*, a potential biocontrol agent for root-knot nematodes. Kerry, B.R & Bourne, J.M. (eds.). IOBC/WPRS, Gent. 84 pp.
- Agrios, N. G.** (2005) Plant Pathology. 5. th. ed. Elsevier Academic Press, Burlington. 922 pp.
- Alegria, N.** (2007) Produção de clamidósporos do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & Gams, estirpe PcMR em cultura líquida. Tese de Licenciatura, Universidade de Évora, 28 pp.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. & Blackwell, M.** (1996) Introductory Mycology. 4<sup>th</sup> ed. New York: John Willar & Sons. 869 pp.
- Atkins, S., Hidalgo-Diaz, L., Clark, I., Morton, O., Montes de Oca, N., Gray, P. & Kerry, B. R.** (2003) Approaches for Monitoring the Release of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*, a Biocontrol Agent for Root-knot Nematodes, *Mycological Research*, 107, pp. 206 -212.
- Barnes, G. L., Boethel, O. J. & Eikenbary, R. D.** (1975) Growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various peptone sources. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 25, 3, pp. 301-305.
- Belitz, H. D. & Grosch, W.** (1999) Food Chemistry. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 992 pp.
- Bird, A. F. & Rogers, G. E.** (1965) Ultrastructure of the cuticle and its formation in *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 11, pp.224–230.
- Calvo, A., Hinze, L., Gardner, W. & Keller, N.** (1999) Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of *Aspergillus* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, pp.3668-3673.

- Cannayane, I. & Jonathan, E. I.** (2008) Nematode egg parasitic fungus – II: *Pochonia chlamydosporia* scope for commercial exploitation – a review, *Agricultural Reviews* – Agricultural Research Communications Centre, India, 29, pp. 48-54.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C. & Goodway, G. W.** (2001) *The Fungi*, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, London, pp. 149-155.
- Ciotola M., DiTommaso A. & Watson A. K.** (2000) Chlamydospore Production, Inoculation Methods and Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* M12-4A, a Biocontrol for *Striga hermonthica*, *Biocontrol Science and Technology*, 10, 2, pp. 129-145(17).
- Clifton, C., E. Raffel, S. & Barker, H., A.** (1951) Annual review of microbiology. Volume 5. Annual reviews, Inc. Stanford, California, USA
- Cliquet, S. & Jackson, M. A.** (1999) Influence of culture conditions on production and freeze-drying tolerance of *Paecilomyces fumosoroseus* blastospores, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23, pp. 97–102.
- Couteaudier, Y. & Alabouvette, C.** (1990) Survival and inoculum potential of conidia and chlamydospores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* in soil. *Can. J. Microbiol.* 36, pp.551-556.
- Crump, D. H. & Irving F.** (1992) Selection of isolates and methods of culturing *Verticillium chlamydosporium* and its efficacy as a biological control agent of beet and potato cyst nematodes. *Nematologica*, 38, pp. 367-374.
- de Leij, F. A. A. M., Kerry, B. R. & Dennehy, J. A.** (1992) The effect of fungal application rates and nematode density on the effectiveness of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita*. *Nematologica*, 38, pp. 112–122.
- Deacon, J. W.** (1997) *Modern Mycology*. 3<sup>th</sup>. Ed. Blackwell Science. United Kingdom, 303 pp.
- Derakhshan, A. Rabindra, R. J., Ramanujam, B. & Rahimi, M.** (2008) Evaluation of Different Media and Methods of Cultivation on the Production and Viability of Entomopathogenic Fungi, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas, *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11 (11), pp. 1506-1509.

- Duan, W., Yang, E., Xiang, M. & Liu, X.** (2008) Effect of storage conditions on the survival of two potential biocontrol agents of nematodes, the fungi *Paecilomyces lilacinus* and *Pochonia chlamydosporia*. *Biocontrol Science and Technology* 18, pp. 613-620.
- Eisenback, J. D.** (1998) Morphology and Sistematics. In: Plant Nematode interactions, Eds Bakers, K.R., Pederson, G.A.; Windham, G.F., Agronomy monograph, 36, *Soil science society of America*, USA, pp. 37-60.
- Engelkes, C. A., Nuclo, R. L. & Fravel, D. R.** (1997) Effect of carbon, nitrogen, and C:N ratio on growth, sporulation, and biocontrol efficacy of *Talaromyces flavus*. *Phytopathology*, Vol 87, pp. 500-505.
- Esteves, I., Franco, C., Pombo, C., Louro, T., Clara, M. I. & Mota, M.** (2001) Evaluation of three of the fungus *Verticillium chlamydosporium* in different plant root colonization. Proc. Of 11<sup>th</sup> Congress of Mediterranean Phytopathological Union and 3<sup>rd</sup> Congress of Sociedade Portuguesa de fitopatologia, *Andaluz Academic publishing*, Redondo, pp. 430-432.
- Fargues, J., Smits, N., Vidal, C., Vey, A., Vega, F. M. & Quimby, G.** (2002) Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*, *Mycopathologia* 154, pp. 127–138.
- Franco, C.** (Universidade de Évora) (2005a) *Pochonia chlamydosporia* strain PcMR and method to use it in biological control of the root-knot-nematode (*Meloidogyne* spp.), UE, WO2005121314.
- Franco, C.** (Universidade de Évora) (2005b) Meios líquidos para a produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia*, PT, PT103346.
- Franco, C.** (Universidade de Évora) (2006a) Liquid media for chlamydospore production of the fungus *Pochonia chlamydosporia*, UE, WO2007031949.
- Franco, C.** (Universidade de Évora) (2006b) Fungo para controlo biológico de nemátodes, PT, PT103146.

**Franco, C. & Fernandes, J.** (Universidade de Évora) (2004) Método e aparelho para separação de sólidos em suspensões líquidas, através duma filtração apoiada por descolmatação dos filtros, PT, PT102853.

**Franco, C. & Fernandes, J.** (Universidade de Évora) (2009) Method and apparatus for separation of solids in liquid suspensions, by filter unclogging aided filtration, UE, EP1750826.

**Franco, C., Vinagre, L., Clara, I., Vieira dos Santos, C., Abrantes I., Santos, S., Fernandes, J., Neto, E., Ramos, N., Kerry, B. & Magan, N.** (2004) The use of selected isolate of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* in a field trial against *Meloidogyne javanica* and its quantification using both microbiological and molecular techniques. Proceedings of 7th of European Foundation for Plant Pathology and British Society for Plant Pathology Presidential Meeting 2004, Aberdeen, Scotland, UK. EFPP Pub Ireland, 76 pp.

**Franco, C., Esteves, I., Cravo, J., Clara, I. & Mota, M.** (2001) The use of *Verticillium chlamydosporium* isolates, as a biological control agents against *Meloidogyne incognita*, in a green pepper pot test evaluation. Proc. Of 11<sup>th</sup> Congress of Mediterranean Phytopathological Union and 3<sup>rd</sup> Congress of Sociedade Portuguesa de fitopatologia, Andaluz Academic publishing, Redondo, pp. 154-156.

**Gams, W.** (1988) A contribution to the knowledge of nematophagous species of *Verticillium*. *Journal of Plant Pathology*, 94, pp. 123-148.

**Goddard, N. H.** (1913) Can fungi living in agricultural soil assimilate free nitrogen? *Botanical Gazette* 56, pp. 249–305.

**Gottlieb, D. & Etten, J. K. V.** (1966) Changes in fungi age. I – Chemical composition of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium bataticola*. *Journal of bacteriology*, 91, pp. 161-168.

**Grandison, A. S. & Lewis M. J.** (1996) Separation processes in food and biotechnology industries. – Principles and Applications. Woodhead Published Limited. Abington, Cambridge CB1 6AH, England. 290 pp.



- Guijarro, B., Larena, I., Melgarejo, P. & De Cal, A.** (2006) Effect of drying on conidial viability of *Penicillium frequentans*, a biological control agent against peach brown rot disease by *Monilinia* spp. *Biocontrol Science and Technology* 16(3), pp. 257-269.
- Hegedus, D. D., Bidochka, M. J., & Khachatourians, G. G.** (1990) *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, pp. 641–647.
- Hidalgo-Diaz, L., Bourne, J. M., Kerry, B. R. & Rodriguez, M. G.** (2000) Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. *International Journal of Pest Management*, 46 pp. 277-284.
- Irving, F. & Kerry, B. R.** (1986) Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. II. Factors affecting parasitism of cyst nematode eggs. *Nematologica*, 32, pp. 474-485.
- Issaly, N., Chauveau, H., Aglevor, F., Fargues, J. & Durand, A.** (2005) Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture, *Process Biochem.* **40**, pp. 1425–1431.
- Jackson, M. A. & Bohthast, R. J.** (1990) Carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio influence submerged-culture conidiation by potential bioherbicide *Colletotrichum truncatum* NRRL 13717. *Applied and environmental microbiology*, pp. 3436-3438.
- Jackson, M. A. & Schisler, D. A.** (1992) The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spores are altered by nutritional environment. *Applied Environmental Microbiology*, 58, pp. 2260-2265.
- Jackson, M. A. & Slininger, P. J.** (1993) Submerged culture conidial germination and conidiation of the bioherbicide *Colletotrichum truncatum* are influenced by the amino acid composition of the medium. *J. Ind. Microbiol.* 12, pp. 417-422.

**Jackson, M. A.** (1997) Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 19, pp.180-187.

**Jackson, M., Erhan, S. & Poprawski, T.** (2006) Influence of Formulation Additives on the Desiccation Tolerance and Storage Stability of Blastospores of The Entomopathogenic Fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), *Biocontrol Science and Technology*, 16, pp. 61-75.

**Jackson, M. A., McGuire, M. R., Lacey, L. A. & Wraight, S. P.** (1997) Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol Res*; 101, pp. 35–41.

**Jager, G. & Velvis, H.** (1988) Inactivation of sclerotia of *Rhizoctonia solani* on potato tubers by *Verticillium biguttatum*, a soil-borne mycoparasite. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 94, pp. 225–231.

**Kamphuis, J. S., Salden, H. J. M. & Zuijderhoudt, F. M. J.** (2001) “Albumine-analyse in plasma: vergelijking tussen de broomcresolgroen, broomcresolpurper en een immunoassay bij volwassen patiënten met en zonder hemodialyse”. *Ned Tijdschr Klin Chem*; 26, pp. 9-12.

**Kennedy, M. J., Reader, S. L. & Davies, R. J.** (1994) The kinetics of developing a fermentation media, *Process Biochemistry*, 29, pp. 529-534.

**Kerry, B. R. & Crump, D. H.** (1998) The dynamics of the decline of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae* in four soils under intensive cereal production. *Fundamental Applied Nematology*, 21, pp. 617-625.

**Kerry, B. R. & Diaz, L. D.** (2004) Challenges for the development of *Pochonia Chlamydosporia* as a biological control agent for *Meloidogyne* spp. Proc. Of XXVII European Society of Nematologists - International Symposium 2004, Rome, Italy. 118 pp.

**Kerry, B. R., Kirkwood, I. A., de Leij, F. A. A., Barba, J., Leijdens, M. B. & Brookes, P. C.** (1993) Growth and survival of *Verticillium*

*chlamydosporium* Goddard, a parasite of nematodes, in soil. *Biol. Control Sci. Technol.* 3, pp.355-365.

**Kerry, B. R. & Crump, D. H.** (1977) Observation on fungal parasites of females and eggs of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*, and other cyst nematodes. *Nematologica*, 23, pp. 193-201.

**Kerry, B. R. & Jaffee, B. A.** (1997) Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. In: The Mycota. IV, Enviromental and Microbial Relationships. Wicklow/Soderstrom (Eds), *Springer-Verlag*, Heidelberg, Berlin, pp. 203-218.

**Kerry, B. R.** (1995) Ecological considerations for the use of the nemathophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium*, to control plant parasitic nematodes. *Can. J. Bot*, 73, pp. 565-570.

**Kerry, B. R.** (1995) Ecological considerations for the use of the nemathophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium*, to control plant parasitic nematodes. *Can. J. Bot*, 73: pp. 565-570.

**Kerry, B. R.** (2000) Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of nematodes. *Annu. Rev. Phytopathology*, 38, pp. 423-441.

**Kerry, B. R.** (2001) Exploitation of the Nematophagous Fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the Biological Control of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.) In: *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. Butt, T. M., Jackson, C. & Magan, N. (Eds), CABI International, Wallingford, pp. 155-168.

**Kerry, B. R.** (1987) Biological control In: Biological control of nematodes: prospects and opportunities Principles and practice of nematode control in crops, R.H. Brown & B.R. Kerry, eds., Sydney, Australia, Academic Press, .pp. 233-263.

**Kerry, B. R., Crump, D. H. & Mullen, L. A.** (1982a) Studies of the cereal-cyst nematode, *Heterodera avenae* under continuous cereals, 1975-1978. II. Fungal parasitism of nematode eggs and females. *Ann. Appl. Biol.*, 100, pp. 489-499.

- Kerry, B. R., Crump, D. H. & Mullen, L. A.** (1982b) Natural control of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae* Woll., by soil fungi at three sites. *Crop Protection*, 1, pp. 99-109.
- Kerry, B. R., Irving, F. & Hornsey, J. C.** (1986) Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. I. Factors affecting growth in vitro. *Nematologica*, 32, pp. 461-473.
- Kerry, B. R. & Bourne, J. M.** (1996) Importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes - a case study using *Verticillium chlamydosporium*. *Pesticide Science* 47, pp. 69–75.
- Kleespies, R. G. & Zimmermann, G.** (1998) Effect of additives on the production, viability and virulence of blastospores of *Metarhizium anisopliae*, *Biocontrol Science and Technology* 8, pp. 207–214.
- Lewis, J. A. & Papavizas, G. C.** (1983) Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* spp. In liquid and solid growth media, *Soil Biology an Biochemistry*, 15, pp. 351-357.
- Lilly, V. G. & Barnett, H. L.** (1951) Physiology of the fungi, McGraw-Hill Book Co., New York, Toronto, London, 464 pp.
- Lin, X. & Heitman, J.** (2005) Chlamydospore formation during hyphal growth in *Cryptococcus neoformans*, *Eukaryotic Cell*, 4, 10, pp. 1746-1754.
- Liu, X. Z. & Chen, S. Y.** (2003) Nutritional requirements of *P. chlamydosporia* and ARF18, fungal parasites of nematode eggs, *J Invertebr Pathol.*, 83, pp. 10-15.
- Louro, T. , Franco, C. , Pombo, C. , Esteves, I., Clara, M. I. & Mota, M.** (2001) Chlamydospore production evaluation of portuguese isolate of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*, Proc. of 11<sup>th</sup> Congress of Mediterranean Phytopathological Union and 3<sup>rd</sup> Congress of Sociedade Portuguesa de fitopatologia, *Andaluz Academic publishing*, Redondo, pp. 433-436.
- Lovett, J. S.** (1976) Regulation of protein metabolism during fungal spore germination. In: The Fungal Spore (Weber, D.J. and W.H. Hess, eds), John Wiley and Sons, New York. pp. 189–242.

**Lozano-Contreras, M. G., Elías-Santos, M., Rivas-Morales, C., Luna-Olvera, H. A., Galán-Wong, L. J. & Maldonado-Blanco, M. G.** (2007) *Paecilomyces fumosoroseus* blastospore production using liquid culture in a bioreactor. *African Journal of Biotechnology* Vol. 6, pp. 2095-2099.

**Magriço, S.** (2007) Estudo dos elementos nutritivos associados à produção de esporos do fungo *Pochonia chlamydosporia*, Tese de Mestrado, 46 pp.

**Mayra, R., Lucila, G. & Viruliche, D.** (2007) Alternativas para la substitucion del Bromuro de Metilo en el manejo de nematodos formadores de agallas (*Meloidogyne* spp.). Revision de la literatura 1995-2006. CD Curso Introducion a la nematologia Agricola. Venezuela. INIA.

**Mckee, T. & Mckee, J. R.** (1999) *Biochemistry - An Introduction*, 2<sup>nd</sup> ed. Mc GrawHill, London, pp. 182-212.

**Miller, G. L.** (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, pp. 426.

**Mo, M., Xu, C. & Zhang, K.** (2005) Effects of carbon and nitrogen sources, carbon-to-nitrogen ratio, and initial pH on the growth of nematophagous fungus *P. chlamydosporia* in liquid culture, *Mycopathologia* 159, pp. 381-387.

**Morgan-Jones, G., Godoy, G. & Rodriguez-Kabana, R.** (1981) *Verticillium chlamydosporium*, fungal parasite of *Meloidogyne arenaria* females. *Nematropica*, 11: 2, pp. 115-120.

**Morgan-Jones, G. & Rodriguez-Kabana, R.** (1987) Fungal biocontrol for the management of nematodes. In: *Vistas on Nematology*, JA Veech (ed.), DW Dickson, 14, pp. 94–99.

**Neidleman, S. L.** (1989) *Advantages in applied microbiology*. Volume 34. Academic Press, Inc. San Diego, California, 328 pp.

**Nordbring-Hertz, B., Jansson, H. B. & Tunlid, A.** (2002) Nematophagous fungi. In: *Encyclopedia of life sciences*. Basingstoke: Macmillan Publishers. 12, pp.681-690.

- Olivares–Bernabeu, C. & Lopez–Llorca, L. V.** (2002) Fungal egg–parasites of plant–parasitic nematodes from spanish soils, *Revista Iberoamericana de Micología*, 19, pp. 104– 110.
- Powell, K. A.** (1993) The commercial exploitation of microorganisms in agriculture. In: Jones DG (ed) Exploitation of microorganisms. Chapman and Hall, New York, pp. 441–459.
- Prescot L. M., Harley J. P. & Klein D. A.** (1996) Microbiology 3rd ed., Wm. C. Brown Publishers, 964 pp.
- Rao, M. S.** (2005) Management of *Meloidogyne javanica* on acid lime nursery seedlings by using formulations of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus*, *Nematologia Mediterranea*, 33, 2, pp. 145-148.
- Roy, H. E., Pell, J. K. & Alderson, P. G.** (2001) Targeted dispersal of the aphid pathogenic fungus *Erynia neoaphidis* by the aphid predator *Coccinella septempunctata*, *Biocontrol Sci. Technol.* **11**, pp. 99–110.
- Siddiqui, Z. A. & Mahmood, I.** (1996) Biological control of plant-parasitic nematodes by fungi: A review. *Bioresource Technology*, 58:pp. 229-239.
- Snedecor, G. W. & Cochran, W. S.** (1980), Statistical Methods, Univ. Press. Iowa, 507 pp.
- Stewart, J. C.** (1980) Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.* 104, pp.10-14.
- Stirling, G. R. & Smith, L. J.** (1998) Field tests of formulated products containing either *Verticillium chlamydosporium* or *Arthrobotrys dactyloides*. *Biol. Contr.* **11**, pp. 229–237.
- Stirling, G. R.** (1991) Biological control of plant-parasitic nematodes. CAB International, Wallingford, UK. 282 pp.
- Sun, M. & Liu, X.** (2006) Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathologia*. 161, pp. 295-305.

- Sung, G. H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J. M., Luangsa-Ard, J. J., Shrestha, B. & Spatafora, J. W.** (2007) Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi, *Stud Mycol.* 57, pp. 5-59.
- Thom, C. & Raper, K.** (1945) Manual of the aspergilli. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md. 373 pp.
- Thomas, K. C., Khachatourians, G. G. & Ingledew, W. M.** (1987) Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Can. J. Microbiol.*, 33, pp. 12–20.
- Ulloa, M. & Hanlin R. T.** (2000) Illustrated Dictionary of Mycology. APS Press, St. Paul, MN, APS Press, 448 pp.
- Van Den Boogert, V. D.** (1989) Nutritional requirements of the mycoparasitic fungus *Verticillium biguttatum*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 95, pp. 149–156
- Vega, F. E., Jackson, M. A. & McGuire, M. R.** (1999) Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Mycopathologia* 147, pp.33–35.
- Vimala Devi, P. S. & Prasad, Y. G.** (1994) Conidia production of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* and its evaluation for control of *Spodoptera litura* (Fab) on *Ricinus communis*. *J. Invertebr. Pathol.* 63, pp. 145-150.
- Whitehead, A. G.** (1997) Plant Nematode Control. CAB International, Wallingford U.K. 448 pp.
- Wright, S. P., Jackson, M. A. & de Kock, S. L.** (2001) Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt T, Jackson C, Magan N (eds), Fungal biocontrol agents-progress, problems and potential, CAB International, Wallingford, UK, pp. 253-287.
- Yang, J. K., Tian, B. Y., Liang, L. M. & Zhang, K. Q.** (2007) Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 75, pp. 21–31.

**Zare, R., Gams, W. & Evans, H. C.** (2001) A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia*, 73, pp. 51-86.

#### **Referências de internet**

**Wabel, C.** (1998) Influence of Lecithin on Structure and Stability of Parenteral Fat Emulsions, Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten

[http://www2.chemie.unierlangen.de/services/dissonline/data/dissertation/Christoph\\_Wabel/html/Chapter1.html](http://www2.chemie.unierlangen.de/services/dissonline/data/dissertation/Christoph_Wabel/html/Chapter1.html)



## Anexos

### I - Tratamento estatístico

Tabela 1 – Teste Tamhane's T2 – Teste da produtividade volumétrica de clamidósporos de PcMR nos meios com glucose, sacarose e amido.

ANOVA - Teste Tamhane <sup>a,b,c</sup> - Clamidósporos	Subgrupo - Média (Clamidósporos/mL)								
	Meio	N	a	B	C	d	e	f	g
Ensaio da variação da Glucose	0	90	7,28E+05						
	2	90	8,57E+05						
	5	90		1,15E+06					
	10	90			3,46E+05				
	15	90				1,18E+05			
	30	90					2,34E+04		
	50	90						4,22E+03	
	API – 30g	90						3,78E+03	
Ensaio da variação da Sacarose	0	90	5,71E+05						
	2	90		8,97E+05					
	5	90			1,10E+06				
	10	90	4,95E+05						
	15	90				2,30E+05			
	30	90					1,38E+05		
	50	90						1,10E+05	
	API – 30g	90							5,22E+03
Ensaio da variação do Amido	0	90	8,34E+05	8,34E+05	8,34E+05	8,34E+05			
	2	90	9,62E+05	9,62E+05	9,62E+05				
	5	90		1,11E+06	1,11E+06				
	10	90		1,07E+06					
	15	90	6,40E+05			6,40E+05			
	30	90	9,88E+05	9,88E+05	9,88E+05				
	50	90	9,02E+05	9,02E+05					
	API – 30g	90					9,00E+03		

a - baseado nas medias observadas

b - A diferença da media é significativa a 0,05

c - não homogeneidade das variâncias de acordo com o teste de Levene.

Tabela 2 – Teste Tamhane's T2 – Teste das medições do peso seco de PcMR nos meios com glucose, sacarose e amido.

ANOVA – Teste Tamhane <sup>a,b,c</sup> - Peso seco	Subgrupo - Média (Peso seco/L)										Desvio Padrão
	Meio	N	a	b	C	d	e	F	G	h	
Ensaio da variação da Glucose	0	45	1,590								0,245
	2	45		2,048							0,208
	5	45			3,077						0,584
	10	45				4,994					0,366
	15	45					5,740				0,644
	30	45						10,224			0,833
	50	45							15,333		1,498
	API – 30g	45								4,243	0,473
Ensaio da variação da Sacarose	0	45	1,649								0,283
	2	45		2,276							0,324
	5	45			3,391						0,899
	10	45				5,152					0,932
	15	45					6,740				0,545
	30	45						10,868			0,600
	50	45							15,754		1,219
	API – 30g	45								4,422	0,507
Ensaio da variação do Amido	0	45	1,644								0,191
	2	45		2,047							0,409
	5	45			2,826						0,277
	10	45				3,673					0,688
	15	45					4,532				0,472
	30	45						4,955			0,449
	50	45							5,328		0,512
	API – 30g	45						4,950			0,436

a - baseado nas medias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c - não homogeneidade das variâncias de acordo com o teste de Levene.

Tabela 3 – Teste Tamhane's T2 – Teste da produção de clamidósporos em função do peso seco de PcMR nos meios com glucose, sacarose e amido.

ANOVA - Teste de Tamhane <sup>a,b,c</sup>	Subgrupo - Média (clamidósporos/g de peso seco)									
	Meio	N	a	b	c	d	e	f	g	h
Ensaio da variação da Glucose	0	90	4,46E+08	4,46E+08						
	2	90	4,15E+08	4,15E+08	4,15E+08					
	5	90		3,64E+08	3,64E+08					
	10	90				7,02E+07				
	15	90					2,00E+07			
	30	90						2,40E+06		
	50	90							3,03E+05	
	API – 30g	90							8,49E+05	
Ensaio da variação da Sacarose	0	90	3,41E+08	3,41E+08	3,41E+08					
	2	90	3,91E+08	3,91E+08						
	5	90	3,20E+08		3,20E+08					
	10	90				1,03E+08				
	15	90					3,51E+07			
	30	90						1,28E+07		
	50	90							7,02E+06	
	API – 30g	90								1,14E+06
Ensaio da variação do Amido	0	90	5,24E+08							
	2	90	4,84E+08							
	5	90		3,92E+08						
	10	90			3,03E+08					
	15	90				2,32E+08				
	30	90					2,01E+08			
	50	90						1,71E+08		
	API – 30g	90							1,88E+06	

a - baseado nas medias observadas; b - A diferença da média é significativa a 0,05

c - não homogeneidade das variâncias de acordo com o teste de Levene

Tabela 4 – Correlação de Pearson entre a média da produção de clamidósporos e peso seco do fungo nos diferentes ensaios do estudo do efeito dos hidratos de carbono. \* Correlação é significativa a um nível de significância de 1%.

Ensaio		Peso seco/Clamidósporos
Ensaio da variação da Glucose	Coefficiente de correlação	- 0,551*
	Sig.	0
	N	360
Ensaio da variação da Sacarose	Coefficiente de correlação	- 0,476*
	Sig.	0
	N	360
Ensaio da variação da Amido	Coefficiente de correlação	- 0,224*
	Sig.	0
	N	360

Tabela 5 – Teste das médias emparelhadas dos clamidósporos entre a produção de clamidósporos nos meios testados.

Concentração (g/L)	Meios	Amostras emparelhadas					t	df	Sig.
		Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de confiança 95%				
					Inferior	superior			
0	Glucose - Sacarose	1,58E+05	2,89E+05	3,02E+04	9,78E+04	2,18E+05	5,23E+00	89	0,000
	Glucose - Amido	-1,08E+05	5,20E+05	5,43E+04	-2,16E+05	-3,87E+02	-1,99E+00	89	0,049
	Sacarose - Amido	-2,66E+05	4,31E+05	4,50E+04	-3,55E+05	-1,77E+05	-5,91E+00	89	0,000
2	Glucose - Sacarose	-5,17E+04	3,35E+05	3,61E+04	-1,24E+05	2,01E+04	-1,43E+00	89	0,156
	Glucose - Amido	-1,17E+05	3,88E+05	4,18E+04	-2,01E+05	-3,43E+04	-2,81E+00	89	0,006
	Sacarose - Amido	-6,57E+04	3,36E+05	3,62E+04	-1,38E+05	6,27E+03	-1,82E+00	89	0,073
5	Glucose - Sacarose	4,94E+04	4,28E+05	4,51E+04	-4,03E+04	1,39E+05	1,10E+00	89	0,276
	Glucose - Amido	4,00E+04	3,56E+05	3,75E+04	-3,45E+04	1,15E+05	1,07E+00	89	0,289
	Sacarose - Amido	-9,44E+03	4,60E+05	4,85E+04	-1,06E+05	8,70E+04	-1,95E-01	89	0,846
10	Glucose - Sacarose	-1,49E+05	4,96E+05	5,23E+04	-2,53E+05	-4,55E+04	-2,86E+00	89	0,005
	Glucose - Amido	-7,25E+05	3,11E+05	3,28E+04	-7,90E+05	-6,60E+05	-2,21E+01	89	0,000
	Sacarose - Amido	-5,76E+05	4,56E+05	4,80E+04	-6,71E+05	-4,80E+05	-1,20E+01	89	0,000
15	Glucose - Sacarose	-1,12E+05	1,43E+05	1,51E+04	-1,42E+05	-8,21E+04	-7,43E+00	89	0,000
	Glucose - Amido	-9,20E+05	3,21E+05	3,39E+04	-9,87E+05	-8,52E+05	-2,71E+01	89	0,000
	Sacarose - Amido	-8,08E+05	2,73E+05	2,88E+04	-8,65E+05	-7,51E+05	-2,81E+01	89	0,000
30	Glucose - Sacarose	-1,15E+05	4,93E+04	5,20E+03	-1,25E+05	-1,05E+05	-2,21E+01	89	0,000
	Glucose - Amido	-9,65E+05	2,33E+05	2,45E+04	-1,01E+06	-9,16E+05	-3,94E+01	89	0,000
	Sacarose - Amido	-8,50E+05	2,52E+05	2,66E+04	-9,03E+05	-7,97E+05	-3,20E+01	89	0,000
50	Glucose - Sacarose	-1,06E+05	3,65E+04	3,85E+03	-1,13E+05	-9,79E+04	-2,75E+01	89	0,000
	Glucose - Amido	-8,97E+05	2,91E+05	3,07E+04	-9,58E+05	-8,37E+05	-2,93E+01	89	0,000
	Sacarose - Amido	-7,92E+05	3,03E+05	3,19E+04	-8,55E+05	-7,29E+05	-2,48E+01	89	0,000
API – 30g	Glucose - Sacarose	-1,44E+03	8,55E+03	9,02E+02	-3,24E+03	3,47E+02	-1,60E+00	89	0,113
	Glucose - Amido	-5,22E+03	1,38E+04	1,45E+03	-8,10E+03	-2,34E+03	-3,60E+00	89	0,001
	Sacarose - Amido	-3,78E+03	1,32E+04	1,39E+03	-6,54E+03	-1,01E+03	-2,71E+00	89	0,008

Tabela 6 – Teste das médias emparelhadas do peso seco para os diferentes meios.

Amostras emparelhadas									
Concentração (g/L)	Meios	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de confiança 95%		t	df	Sig.
					Inferior	superior			
0	Glucose – Sacarose	-0,051	0,174	0,026	-0,104	0,001	-1,976	44	0,054
	Glucose - Amido	-0,046	0,268	0,040	-0,127	0,034	-1,164	44	0,251
	Sacarose - Amido	0,005	0,326	0,049	-0,093	0,103	0,101	44	0,920
2	Glucose – Sacarose	-0,228	0,335	0,050	-0,329	-0,127	-4,560	44	0,000
	Glucose - Amido	0,000	0,426	0,063	-0,127	0,128	0,007	44	0,994
	Sacarose - Amido	0,228	0,467	0,070	0,088	0,369	3,282	44	0,002
5	Glucose – Sacarose	-0,314	0,580	0,087	-0,488	-0,139	-3,627	44	0,001
	Glucose - Amido	0,251	0,576	0,086	0,078	0,424	2,922	44	0,005
	Sacarose - Amido	0,565	0,874	0,130	0,302	0,827	4,338	44	0,000
10	Glucose – Sacarose	-0,157	1,102	0,164	-0,488	0,174	-0,958	44	0,343
	Glucose - Amido	1,321	0,757	0,113	1,093	1,548	11,702	44	0,000
	Sacarose - Amido	1,478	1,057	0,158	1,161	1,796	9,381	44	0,000
15	Glucose – Sacarose	-1,000	0,585	0,087	-1,176	-0,824	-11,472	44	0,000
	Glucose - Amido	1,208	0,819	0,122	0,962	1,455	9,896	44	0,000
	Sacarose - Amido	2,208	0,597	0,089	2,029	2,388	24,830	44	0,000
30	Glucose – Sacarose	-0,644	0,737	0,110	-0,866	-0,423	-5,866	44	0,000
	Glucose - Amido	5,269	0,816	0,122	5,024	5,514	43,299	44	0,000
	Sacarose - Amido	5,913	0,673	0,100	5,711	6,115	58,956	44	0,000
50	Glucose – Sacarose	-0,422	1,439	0,214	-0,854	0,010	-1,969	44	0,055
	Glucose - Amido	10,003	1,737	0,259	9,481	10,525	38,623	44	0,000
	Sacarose - Amido	10,425	1,409	0,210	10,002	10,849	49,624	44	0,000
API – 30g	Glucose – Sacarose	-0,180	0,430	0,064	-0,309	-0,050	-2,803	44	0,008
	Glucose - Amido	-0,707	0,521	0,078	-0,864	-0,551	-9,110	44	0,000
	Sacarose - Amido	-0,528	0,458	0,068	-0,665	-0,390	-7,727	44	0,000

Tabela 7 – Teste Tamhane's T2 – Teste da produtividade volumétrica dos clamidósporos de PcMR nos meios com ácidos gordos.

ANOVA – Teste de Tamhane <sup>a,b,c</sup> Clamidósporos	Meio	N	Subgrupo - Média (Clamidósporos/mL)									
			a	b	C	d	e	f	g	h	i	j
Ensaio dos Ácidos Gordos	ALMA	90	9,86E+05									
	AMA	90		4,6E+04	4,6E+04	4,6E+04						
	P	90		7,0E+04	7,0E+04							
	E	90		3,7E+04		3,7E+04						
	O	90					2,4E+05		2,4E+05	2,4E+05	2,4E+05	
	L	90						3,9E+05			3,9E+05	
	E + O	90					1,7E+05		1,7E+05			
	E + L	90						3,5E+05		3,5E+05	3,5E+05	
	E + P	90		5,8E+04	5,8E+04							
	O + P	90					2,7E+05			2,7E+05	2,7E+05	
	L + P	90						4,7E+05			4,7E+05	
	L + O	90					3,6E+05	3,6E+05		3,6E+05	3,6E+05	
	API – 30g	90										1,6E+03

a - baseado nas médias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c - não homogeneidade das variâncias de acordo com o teste de Levene.

Tabela 8 – Teste Tamhane's T2 – Teste das medições do peso seco de PcMR nos meios com ácidos gordos.

ANOVA - Teste de Tamhane <sup>a,b,c</sup> Peso Seco		Meio	N	Subgrupo - Média (Peso seco/L)									Desvio Padrão
				a	B	C	d	e	f	g	H	i	
Ensaio dos Ácidos Gordos	ALMA	45	3,61	3,61	3,61	3,61	3,61	3,61	3,61	3,61	3,61	3,61	0,50
	AMA	45	3,08	3,08					3,08	3,08	3,08		0,35
	P	45	3,94		3,94	3,94							0,64
	E	45	4,03		4,03	4,03							0,50
	O	45	2,57				2,57				2,57		0,52
	L	45	3,33	3,33				3,33	3,33	3,33			0,70
	E + O	45	3,52		3,52			3,52	3,52				0,69
	E + L	45	3,27	3,27				3,27	3,27	3,27			0,56
	E + P	45	3,91		3,91	3,91			3,91				0,47
	O + P	45	2,92	2,92			2,92	2,92			2,92		0,59
	L + P	45	3,13	3,13				3,13	3,13	3,13			0,82
	L + O	45	2,59				2,59				2,59		0,45
	API – 30g	45	4,68	4,68								4,68	0,644

a - baseado nas médias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c - não homogeneidade das variâncias de acordo com o teste de Levene.

Tabela 9 – Teste Tamhane's T2 – Teste da produção de clamidósporos em função do peso seco de PcMR nos meios com ácidos gordos.

ANOVA - Teste de Tamhane <sup>a,b,c</sup>	Meio	N	Subgrupo - Média (Clamidósporos/g de peso seco)								
			a	b	c	D	e	F	g	h	i
Ensaio dos Ácidos Gordos	ALMA	45	2,64E+08								
	AMA	45		1,40E+07	1,40E+07	1,40E+07					
	P	45		1,83E+07	1,83E+07						
	E	45		9,28E+06		9,28E+06					
	O	45					1,12E+08		1,12E+08	1,12E+08	
	L	45					1,14E+08		1,14E+08		
	E + O	45						4,40E+07			
	E + L	45					1,15E+08		1,15E+08		
	E + P	45		1,47E+07	1,47E+07						
	O + P	45					8,24E+07			8,24E+07	
	L + P	45					1,29E+08		1,29E+08		
	L + O	45					1,29E+08		1,29E+08		
	API – 30g	45									3,22E+05

a - baseado nas médias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c - não homogeneidade das variâncias de acordo com o teste de Levene.

Tabela 10 – Teste Tamhane's T2 – Teste da produtividade volumétrica de clamidósporos de PcMR nos meios diferentes concentrações de ácido oleico.

ANOVA – Teste de Tamhane <sup>a,b,c</sup> Clamidósporos	Meio	N	Subgrupo - Média (Clamidósporos/mL)				
			A	B	c	d	e
Ensaio da Variação do Ácido Oleico	ALMA	90	5,54E+05				
	AMA	90		7,34E+04		7,34E+04	
	0,2	90			1,30E+05	1,30E+05	
	0,4	90			1,30E+05	1,30E+05	
	0,6	90			1,22E+05	1,22E+05	
	0,8	90			1,18E+05	1,18E+05	
	1	90		9,91E+04	9,91E+04	9,91E+04	
	API -30g	90					2,67E+03

a - baseado nas médias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c - não homogeneidade das variâncias de acordo com o teste de Levene.

Tabela 11 – Teste Tamhane's T2 – Teste das medições do peso seco de PcMR dos ensaios da variação da concentração de ácido oleico.

ANOVA - Teste de Tamhane <sup>a,b,c</sup> - Peso Seco	Meio	N	Subgrupo - Média (Peso seco/L)							Desvio Padrão
			a	B	c	d	e	f	g	
Ensaio da Variação do Ácido Oleico	ALMA	45	2,965	2,965						0,605
	AMA	45	2,605	2,605	2,605	2,605				0,908
	0,2	45		2,514	2,514	2,514				0,677
	0,4	45		2,292	2,292	2,292	2,292			0,635
	0,6	45		2,090		2,090	2,090	2,090		0,195
	0,8	45				2,076	2,076	2,076		0,546
	1	45					1,936	1,936		0,326
	API - 30g	45							6,478	0,636

a - baseado nas medias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c - não homogeneidade das variâncias de acordo com o teste de Levene.

Tabela 12 – Teste Tamhane's T2 – Teste da produção de clamidósporos em relação ao peso seco de PcMR nos meios com diferentes concentrações de ácido oleico.

ANOVA - Teste de Tamhane <sup>a,b,c</sup>	Meio	N	Subgrupo - Média (clamidósporos/g de peso seco)				
			a	b	c	d	e
Ensaio da Variação do Ácido Oleico	ALMA	45	2,03E+08				
	AMA	45		3,54E+07		3,54E+07	
	0,2	45			6,86E+07	6,86E+07	
	0,4	45			5,93E+07	5,93E+07	
	0,6	45			5,82E+07	5,82E+07	
	0,8	45			6,12E+07	6,12E+07	
	1	45		5,18E+07	5,18E+07	5,18E+07	
	API – 30g	45					3,96E+05

a - baseado nas medias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c - não homogeneidade das variâncias de acordo com o teste de Levene.



Tabela 13 – Teste Tamhane's T2 – Teste da produtividade volumétrica de clamidósporos de PcMR nos meios diferentes concentrações de ácido palmítico.

ANOVA - Teste de Tamhane <sup>a,b,c</sup> - Clamidósporos	Meio	N	Subgrupo - Média (Clamidósporos/mL)					
			A	B	c	d	e	f
Ensaio da Variação do Ácido Palmítico	ALMA	90	6,09E+05					
	AMA	90		1,17E+04				
	0,2	90			2,49E+04	2,49E+04		
	0,4	90			2,92E+04	2,92E+04	2,92E+04	
	0,6	90				3,69E+04	3,69E+04	
	0,8	90			2,38E+04	2,38E+04		
	1	90			2,84E+04	2,84E+04	2,84E+04	
	API – 30g	90						3,33E+03

a - baseado nas médias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c - não homogeneidade das variâncias de acordo com o teste de Levene.

Tabela 14 – Teste Tamhane's T2 – Teste das medições do peso seco de PcMR dos ensaios da variação da concentração de ácido palmítico.

ANOVA - Teste de Tamhane <sup>a,b,c</sup> - Peso Seco	Meio	N	Subgrupo - Média (Peso seco/L)					Desvio Padrão
			A	b	c	d	e	
Ensaio da Variação do Ácido Palmítico	ALMA	15	3,053			3,053		0,654
	AMA	15	2,254			2,254		0,529
	0,2	15		2,254	2,254	2,254		0,530
	0,4	15		2,191	2,191			0,485
	0,6	15		2,205	2,205	2,205		0,504
	0,8	15		2,383	2,383	2,383		0,573
	1	15	2,611	2,611		2,611		0,709
	API – 30g	15					6,265	0,660

a - baseado nas medias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c - não homogeneidade das variâncias de acordo com o teste de Levene.

Tabela 15 – Teste Tamhane's T2 – Teste da produção de clamidósporos em função do peso seco de PcMR nos meios com diferentes concentrações de ácido palmítico.

ANOVA - Teste de Tamhane <sup>a,b,c</sup>	Meio	N	Subgrupo - Média (clamidósporos/g de peso seco)				
			A	B	c	d	e
Ensaio da Variação do Ácido Palmítico	ALMA	15	2,22E+08				
	AMA	15		3,95E+06			
	0,2	15			1,17E+07	1,17E+07	
	0,4	15			1,34E+07	1,34E+07	
	0,6	15			1,67E+07	1,67E+07	
	0,8	15			9,57E+06		
	1	15			1,09E+07	1,09E+07	
	API – 30g	15					5,35E+05

a - baseado nas médias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c - não homogeneidade das variâncias de acordo com o teste de Levene.

Tabela16 – Teste Tamhane's T2 – Teste da produtividade volumétrica de clamidósporos de PcMR nos meios com triglicéridos.

ANOVA - Teste Tamhane <sup>a,b,c</sup> - Clamidósporos	Meio	N	Subgrupo - Média (clamidósporos/mL)				
			a	b	c	d	e
Ensaio dos Triglicéridos	ALMA	90	3,99E+05				
	AMA	90		3,00E+04			
	Trioleato	90			1,32E+05		
	Tripalmitato	90				5,07E+04	
	Óleo de Girassol	90			1,01E+05		
	API – 30g	90					4,11E+03

a - baseado nas médias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c - não homogeneidade das variâncias de acordo com o teste de Levene.

Tabela 17 – Teste Tamhane's T2 – Teste das medições do peso seco de PcMR do estudo do efeito dos triglicéridos.

ANOVA – Teste de Tamhane <sup>a,b,c</sup> - Peso Seco	Meio	N	Subgrupo - Média (Peso seco/L)					Desvio Padrão
			a	2	b	c	d	
Ensaio dos Triglicéridos	ALMA	45	3,105	3,105				0,530
	AMA	45	2,916	2,916		2,916		0,666
	Trioleato	45			2,419	2,419		0,438
	Tripalmitato	45	3,178	3,178				0,496
	Óleo de Girassol	45		2,676	2,676	2,676		0,480
	API – 30g	45					6,180	1,026

a - baseado nas médias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c - não homogeneidade das variâncias de acordo com o teste de Levene.

Tabela 18 - Teste Tamhane's T2 – Teste da produção de clamidósporos em função do peso seco de PcMR nos meios com diferentes concentrações dos triglicéridos.

ANOVA - Teste de Tamhane <sup>a,b,c</sup>	Meio	N	Subgrupo - Média (clamidósporos/g de peso seco)				
			A	b	c	d	e
Ensaio dos Triglicéridos	ALMA	45	1,36E+08				
	AMA	45		1,07E+07			
	Trioleato	45			5,33E+07		
	Tripalmitato	45		1,58E+07			
	Óleo de Girassol	45				3,55E+07	
	API – 30g	45					6,70E+05

a - baseado nas médias observadas

b - A diferença da média é significativa a 0,05

c - não homogeneidade das variâncias de acordo com o teste de Levene.